

# **Intra- und extrazelluläre Signale während der T-Zellaktivierung und -differenzierung**

D i s s e r t a t i o n  
zur Erlangung des akademischen Grades  
d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m  
(Dr. rer. nat.)  
im Fach Biologie  
eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
der Humboldt-Universität zu Berlin  
von

Diplom-Biologin Julia Schumann

Präsident der Humboldt-Universität Berlin  
Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Prof. Stefan Hecht, Ph.D.

Gutachter/innen:	1.	Prof. Dr. Hans-Dieter Volk
	2.	Prof. Dr. Edgar Schmitt
	3.	Prof. Dr. Andreas Radbruch

Tag der mündlichen Prüfung: 01.10.2014



## DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen danken, ohne deren Unterstützung ein Gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein herzlichster Dank gilt in erster Linie Prof. Dr. Birgit Sawitzki für die Bereitstellung des Promotionsthemas, die Möglichkeit die Dissertation in ihrer Arbeitsgruppe anfertigen zu können und ihre hervorragende Betreuung von Beginn an. Ihre Unterstützung und Ermutigung halfen mir über so manche Hürde während der Promotionszeit. Neben ihrer wissenschaftlichen Expertise und der Förderung dieser Arbeit, schätze ich ihren Enthusiasmus und ihr Engagement, mit dem sie wissenschaftliche Projekte und andere Belange vertritt. All das hat mir während meiner Promotionszeit sehr geholfen und zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Prof. Dr. Hans-Dieter Volk danke ich für die Möglichkeit meine Dissertation am Institut für medizinische Immunologie der Charité anfertigen zu können.

Ebenso möchte ich meinen Kollegen der AG Sawitzki (Christine, Katarina, Ivo, Ulrike, Simone, Katrin, Steffi, Stephan, David und Anders) für Ratschläge, Protokolle und die tatkräftige Unterstützung danken. Sie alle waren verantwortlich für ein tolles Arbeitsklima und eine warme Atmosphäre. Eine charakteristische und herausragende Eigenschaft der Arbeitsgruppe war die stetige Hilfsbereitschaft in Momenten, in denen zwei Hände nicht ausreichten. Ich möchte außerdem Katarina Stanko, Christine Appelt und Ivo Panov für die Unterstützung bei den *in vivo* Versuchen danken.

Des Weiteren möchte ich PD Dr. Gerald Grütz und allen weiteren Mitgliedern unseres wöchentlichen *joint group meetings* für ihre Kritik und Anregungen danken.

Außerdem möchte ich mich bei allen Kooperationspartnern bedanken. Mein herzlichster Dank gilt Dr. Friederike Berberich-Siebelt für ihre Unterstützung in inhaltlichen Fragen und Hilfe bei der Mausezucht. Danken möchte ich außerdem Dr. Martin Vöth für die Hilfe bei methodischen Fragen und Dr. Michael Schumann für seine schnelle und kompetente Hilfe bei der konfokalen Mikroskopie. Mein besonderer Dank gilt auch meinen Kooperationspartnern Dr. Simone Wörtge, Elena Wiese und Prof. Dr. Ari Waisman für die Unterstützung bei der Generierung der transgenen Mauslinie. Ich möchte mich auch herzlich bei Dr. Thomas Wunderlich für die freundliche Bereitstellung des Zielvektors bedanken. Ebenfalls möchte ich mich bei Dr. Desirée Kunkel und Antje Maluk für die Hilfe beim FACS-Sorting bedanken.

Ich möchte meiner Familie und Sven für den Rückhalt und die Unterstützung während der gesamten Promotionszeit, sowie für die Durchhalteparolen auf den letzten Metern herzlich danken.





# INHALT

<b>Danksagung.....</b>	<b>III</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>IX</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>XI</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>XII</b>
Allgemeine Abkürzungen .....	XII
Abkürzungen für verwendete physikalische Größen .....	XV
Abkürzungen für Einheitenvorsätze .....	XV
<b>1 Allgemeine Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 T-Zellaktivierung .....	1
1.2 Bildung von T-Helferzellen .....	3
1.3 Bildung von Gedächtnis-T-Zellen .....	5
1.4 Transplantation .....	6
1.5 Rolle von T-Zellen während der Transplantation .....	7
1.6 Zielsetzung der Arbeit .....	9
<b>2 Intrazelluläre Signale während der T-Zellaktivierung und -differenzierung .....</b>	<b>11</b>
2.1 Einleitung .....	11
2.1.1 TCAIM ( <i>T cell activation inhibitor, mitochondrial</i> ) .....	11
2.1.2 Mitochondrien und ihre Aufgaben .....	12
2.1.3 Die Rolle von Mitochondrien während der T-Zellaktivierung .....	15
2.1.4 Genetische Systeme und die Generierung von transgenen Mäusen .....	17
2.1.5 Spezifische Fragestellung .....	20
2.2 Ergebnisse .....	21
2.2.1 Generierung einer <i>Tcaim</i> -überexprimierenden Mauslinie ( <i>Tcaim</i> knock-in) .....	21
2.2.2 Phänotypische Charakterisierung der <i>Tcaim</i> KI Mauslinie .....	28
2.2.3 Untersuchung von T-Zellsubpopulationen in <i>Tcaim</i> KI- und Kontrolltieren .....	31
2.2.4 Untersuchung der Mitochondrien von <i>Tcaim</i> -überexprimierenden CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	33
2.2.5 Auswirkungen der <i>Tcaim</i> -Expression auf die Aktivierung von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	37
2.2.6 Auswirkungen der <i>Tcaim</i> -Expression während einer allogenen Hauttransplantation .....	39
2.3 Diskussion .....	43
2.3.1 Generierung einer T-Zell spezifischen <i>Tcaim</i> KI Maus .....	43
2.3.2 Phänotypische Analyse von Zellpopulationen in der <i>Tcaim</i> KI Maus .....	44
2.3.3 TCAIM verändert mitochondriale Eigenschaften während der T- Zellaktivierung .....	46
2.3.4 Eine konstante <i>Tcaim</i> -Expression reduziert die Bildung von Gedächtnis T-Zellen .....	49

2.3.5	Eine konstante <i>Tcaim</i> -Expression in T-Zellen verhindert die Abstoßung von allogenen Hauttransplantaten .....	49
2.3.6	Gegenwärtiges Modell und Ausblick .....	51
<b>3</b>	<b>Extrazelluläre Signale während der T-Zellaktivierung und -differenzierung .....</b>	<b>55</b>
3.1	Einleitung.....	55
3.1.1	CD44-Proteinstruktur und -Expression .....	55
3.1.2	CD44-Liganden .....	55
3.1.3	CD44 und dessen Funktionen in T-Zellen .....	56
3.1.4	CD44 in Th-Zellen.....	58
3.1.5	Spezifische Fragestellung.....	59
3.2	Ergebnisse .....	61
3.2.1	Alloreaktive Th1 und Th17-Zellen unterscheiden sich in ihrer CD44-Expression <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> .....	61
3.2.2	Polarisierende Bedingungen verstärken die Unterschiede in der CD44-Expression zwischen Th17- und Th1-Zellen .....	63
3.2.3	Die Blockierung von CD44 verringert die Anzahl von IL-17 <sup>+</sup> - aber nicht von IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	64
3.2.4	Eine geringe TZR- und Kostimulation unterstützt die Th17-Differenzierung.....	65
3.2.5	Eine hohe CD44-Oberflächenexpression korreliert positiv mit dem Level an Phospho-ZAP-70 .....	66
3.3	Diskussion.....	67
3.3.1	Signaltransduktion via CD44.....	68
3.3.2	Extrazelluläre Stimuli .....	68
3.3.3	Th17-Zellen profitieren von einer erhöhten CD44-Expression.....	69
3.3.4	Ausblick .....	71
<b>4</b>	<b>Material .....</b>	<b>73</b>
4.1	Antikörper .....	73
4.2	Chemikalien und Reagenzien.....	73
4.3	Enzyme und Zellen.....	74
4.4	Geräte .....	74
4.5	Grundlösungen, Puffer, Medien und deren Zusätze .....	75
4.5.1	Grundlösungen .....	75
4.5.2	Rezepturen für Puffer und Medien .....	76
4.5.3	Zusätze für Zellkulturmedien.....	76
4.6	Kits .....	77
4.7	Mausstämme.....	77
4.8	Sequenzen und Plasmide .....	78

4.8.1	Primer zur Typisierung und Klonierung .....	78
4.8.2	Oligonukleotide für die quantitative Echtzeit-PCR .....	78
4.8.3	Plasmide und Southern Blot Sonde .....	78
4.9	Software .....	78
4.10	Weitere Verbrauchsmaterialien .....	79
4.11	Zytokine, Stimulantien und Inhibitoren .....	79
4.11.1	Zytokine .....	79
4.11.2	Stimulantien und Inhibitoren .....	80
<b>5</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>81</b>
5.1	Herstellung des Zielvektors <i>pR26-Tcaim</i> .....	81
5.1.1	Klonierung des <i>Tcaim</i> -Leserahmens in pDrive .....	81
5.1.2	Herstellung kompetenter Bakterien .....	81
5.1.3	Transformation durch Hitzeschock .....	82
5.1.4	Kolonie-PCR .....	82
5.1.5	Klonierung des <i>Tcaim</i> -Leserahmens in <i>pR26</i> .....	82
5.1.6	DNA-Fällung .....	84
5.2	Herstellung und Injektion <i>Tcaim</i> -transgener Stammzellen .....	84
5.2.1	Auftauen von EF-Zellen der Generation 0 .....	85
5.2.2	Trypsinisieren und Expansion der EF-Zellen .....	85
5.2.3	Mitomycin C-Behandlung von EF-zellen (=MEF-Zellen) .....	85
5.2.4	Einfrieren von (M)EF-Zellen .....	85
5.2.5	Auftauen und Ausplattieren von (M)EF-Zellen .....	85
5.2.6	Auftauen von ES-Zellen .....	86
5.2.7	Trypsin-Behandlung von ES-Zellen .....	86
5.2.8	Elektroporation von ES-Zellen .....	86
5.2.9	Picken von Geneticin-resistenten ES-Zellkolonien .....	86
5.2.10	Gelatinebeschichtung von Zellkulturplatten .....	87
5.2.11	Elektroporation eines Cre-Expressionsvektors ( <i>pGK-Cre</i> ) .....	87
5.2.12	Vorbereitung der ES-Zellen zur Karyotypisierung .....	87
5.2.13	Injektion der ES-Zellklone .....	87
5.3	Southern Blot .....	88
5.4	Genotypisierung .....	89
5.4.1	<i>R26</i> Typisierungs-PCR .....	89
5.4.2	<i>Cd4-Cre</i> Typisierungs-PCR .....	90
5.4.3	<i>Tcaim</i> Typisierungs-PCR .....	91
5.5	Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR: <i>quantitative real time PCR</i> ) .....	91

5.6	Zellkultur von Primärzellen .....	92
5.6.1	Generierung von BMDCs.....	92
5.6.2	Allogene Kokultur .....	93
5.6.3	Polyklonale Zellkultur.....	93
5.7	Markierung mit Proliferations-Farbstoffen .....	94
5.8	Spezielle Behandlungen und Th-Zellpolarisierungen .....	94
5.9	Zellsortierung mittels Fluoreszenzfärbung.....	94
5.10	Fluoreszenz-Färbungen .....	95
5.10.1	Apoptose-Färbung .....	95
5.10.2	Lebend/Tot-Färbung.....	95
5.10.3	Oberflächenfärbung .....	96
5.10.4	Intrazelluläre Färbung .....	96
5.10.5	Messung des Kalziumeinstroms .....	96
5.10.6	mROS Färbung .....	96
5.10.7	Zytokinbestimmung im Überstand von Kokulturen.....	97
5.11	Fluoreszenzmikroskopie.....	97
5.12	Allogene Hauttransplantation .....	97
5.13	Statistik .....	98
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>99</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>100</b>
<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>101</b>
8.1	Sequenz des <i>Tcain</i> -Leserahmens.....	101
8.2	Konfigurationen der FACS-Geräte .....	103
8.2.1	FACSCalibur .....	103
8.2.2	LSRII .....	103
8.2.3	LSRFortessa .....	104
<b>9</b>	<b>Referenzen .....</b>	<b>105</b>
<b>10</b>	<b>Publikationsliste .....</b>	<b>121</b>
<b>11</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>123</b>

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>Abbildung 1- 1</b>	Signaltransduktion während der T-Zellaktivierung .....	3
<b>Abbildung 1- 2</b>	Differenzierung und Eigenschaften von T <sub>H</sub> 1-, T <sub>H</sub> 2- und T <sub>H</sub> 17-Zellen .....	4
<b>Abbildung 1- 3</b>	Mechanismen der Alloantigen-Erkennung.....	8
<b>Abbildung 2- 1</b>	Aufbau von Mitochondrien .....	13
<b>Abbildung 2- 2</b>	Bildungsorte von mROS .....	14
<b>Abbildung 2- 3</b>	Darstellung der Redoxsensitivität von Proteinen .....	15
<b>Abbildung 2- 4</b>	<i>LoxP</i> -Sequenz und Cre-vermittelte Rekombination.....	19
<b>Abbildung 2- 5</b>	<i>Tcaim</i> -Expression in CD4 <sup>+</sup> T-Zellen nach polyklonaler Stimulation .....	21
<b>Abbildung 2- 6</b>	Schema zur homologen Rekombination des Zielvektors mit dem wildtypischen <i>R26</i> Locus.....	21
<b>Abbildung 2- 7</b>	Southern Blot der expandierten ES-Zellklone .....	22
<b>Abbildung 2- 8</b>	Überprüfung des 3'-Endes des mutierten <i>R26</i> Locus .....	23
<b>Abbildung 2- 9</b>	Expression von Pluripotenzmarkern verschiedener ES-Zellklone.....	23
<b>Abbildung 2- 10</b>	Beispiele von Metaphasen der Chromosomenanalyse .....	24
<b>Abbildung 2- 11</b>	Genotypisierung zur Identifizierung der <i>Tcaim</i> -Transmission .....	25
<b>Abbildung 2- 12</b>	Genotypenverteilung der Kreuzung von <i>Tcaim</i> KI und <i>Cd4-Cre</i> Mäusen.....	26
<b>Abbildung 2- 13</b>	<i>Tcaim</i> mRNA und eGFP Level der unterschiedlichen Genotypen in CD4 <sup>+</sup> T-, CD8 <sup>+</sup> T- und CD19 <sup>+</sup> B-Zellen .....	27
<b>Abbildung 2- 14</b>	Vergleich der Organgrößen, absoluten Zellzahlen und Zusammensetzung der Thymi aus <i>Tcaim</i> KI und Kontrolltieren.....	29
<b>Abbildung 2- 15</b>	Vergleich der Organgrößen und absoluten Zellzahlen der Milz und Lymphknoten aus <i>Tcaim</i> KI und Kontrolltieren.....	30
<b>Abbildung 2- 16</b>	Vergleich der Zusammensetzung der Milz und Lymphknoten aus <i>Tcaim</i> KI und Kontrolltieren .....	30
<b>Abbildung 2- 17</b>	Expression der Oberflächenmarker CD44 und CD62L in CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz naiver Tiere.....	32
<b>Abbildung 2- 18</b>	Verteilung von T <sub>Regs</sub> in der Milz von <i>Tcaim</i> KI und Kontrolltieren.....	33
<b>Abbildung 2- 19</b>	Morphologie der Mitochondrien von aktivierten <i>Tcaim</i> -überexprimierenden CD4 <sup>+</sup> T-Zellen und Kontrollzellen.....	34
<b>Abbildung 2- 20</b>	Zelltod und Apoptose in <i>Tcaim</i> -überexprimierenden CD4 <sup>+</sup> T-Zellen und Kontrollzellen.....	35
<b>Abbildung 2- 21</b>	Untersuchungen des Kalziumeinstroms nach T-Zellstimulation.....	36
<b>Abbildung 2- 22</b>	Vergleich der mROS Produktion von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen aus <i>Tcaim</i> KI und Kontroll-Mäusen .....	36
<b>Abbildung 2- 23</b>	Aktivierung und Proliferation von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen aus <i>Tcaim</i> KI <sup>+/+</sup> <i>Cd4-Cre</i> und <i>Cd4-Cre</i> Mäusen nach allogener Kokultur .....	38
<b>Abbildung 2- 24</b>	Bestimmung der Zytokine IL-2, IL-17 und IFN- $\gamma$ im Überstand von allogenen Kokulturen mit <i>Tcaim</i> KI <sup>+/+</sup> <i>Cd4-Cre</i> oder <i>Cd4-Cre</i> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	39
<b>Abbildung 2- 25</b>	Schema zum experimentellen Aufbau der allogenen Hauttransplantation .....	39
<b>Abbildung 2- 26</b>	Transplantat-Überleben und Gewichtsverlauf nach allogener Hauttransplantation von rekonstituierten <i>Rag-1</i> KO Mäusen .....	40
<b>Abbildung 2- 27</b>	Charakterisierung der <i>Tcaim</i> KI <sup>+/+</sup> <i>Cd4-Cre</i> bzw. <i>Cd4-Cre</i> T-Zellen aus der Milz von <i>Rag-1</i> KO Mäusen 21 Tage nach Transplantation.....	41

<b>Abbildung 2- 28</b>	Charakterisierung der <i>Tcaim</i> KI <sup>+/+</sup> <i>Cd4-Cre</i> bzw. <i>Cd4-Cre</i> T-Zellen im Knochenmark von <i>Rag-1</i> KO Mäusen 21 Tage nach Transplantation .....	42
<b>Abbildung 2- 29</b>	Modell zur Wirkungsweise einer konstanten <i>Tcaim</i> -Expression während der Stimulation von T-Zellen im Vergleich zum Wildtyp .....	52
<b>Abbildung 2- 30</b>	Negative Korrelation zwischen <i>Tcaim</i> -Expression und Glykolyse in naiven, aktivierten und Gedächtnis-T-Zellen.....	54
<b>Abbildung 3- 1</b>	Proteinstruktur von CD44 .....	55
<b>Abbildung 3- 2</b>	Experimenteller Aufbau und CD44-Subpopulationen nach 4-tägiger allogener Kokultur .....	61
<b>Abbildung 3- 3</b>	CD44-Oberflächenexpression unterscheidet alloreaktive T <sub>H</sub> 1- von T <sub>H</sub> 17-Zellen .....	62
<b>Abbildung 3- 4</b>	Polarisierende Bedingungen führen zu Unterschieden in der CD44-Expression von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	63
<b>Abbildung 3- 5</b>	Die TNF- $\alpha$ -Expression bestimmt nicht die differenzielle CD44-Expression von T <sub>H</sub> 1 und T <sub>H</sub> 17-Zellen. ....	64
<b>Abbildung 3- 6</b>	CD45RB-Expression von T <sub>H</sub> 1- und T <sub>H</sub> 17-Zellen.....	64
<b>Abbildung 3- 7</b>	Geringe TZR- und Kostimulation fördern die T <sub>H</sub> 17-Differenzierung.....	65
<b>Abbildung 3- 8</b>	Basale ZAP-70-Phosphorylierung in CD44-exprimierenden Populationen.....	66
<b>Abbildung 3- 9</b>	Schema zum Einfluss von CD44 auf die Aktivierung und Differenzierung von T <sub>H</sub> -Zellen .....	67
<b>Abbildung 5- 1</b>	Vektorkarte von pR26 .....	83
<b>Abbildung 5- 2</b>	Schematische Darstellung der R26 Typisierungs-PCR.....	90
<b>Abbildung 5- 3</b>	Sortierungsstrategie für Experimente zur Rekonstitution von <i>Rag-1</i> KO Mäusen und allogener Kokultur mit CD4 <sup>+</sup> <i>Tcaim</i> KI T-Zellen.....	95
<b>Abbildung 5- 4</b>	Gating Strategie .....	95

## **TABELLENVERZEICHNIS**

<b>Tabelle 2- 1</b>	Häufigkeit und Art der Chromosomenaberrationen in den getesteten klonen ..... 24
<b>Tabelle 2- 2</b>	Auflistung der Injektionsversuche ..... 25
<b>Tabelle 2- 3</b>	Auflistung der Genotypen und der genutzten Abürzungen ..... 26

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

## ALLGEMEINE ABKÜRZUNGEN

---

ADAM	<i>A desintegrin and metalloproteinase domain-containing protein</i>
AF700	Alexa Fluor 700
<i>Amp<sup>r</sup></i>	Ampicillinresistenzgen
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
APC	Allophycocyanin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BMDC	<i>Bone marrow-derived dendritic cell</i>
bp	Basenpaare
BP	<i>Band pass</i> (Filter Durchflusszytometrie)
CAG	<i>Chicken/actin/globulin</i>
CCR7	<i>C-C chemokine receptor type 7</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>Copy DNA</i>
CRAC	<i>Calcium-release activated calcium</i>
Cre	<i>Causes recombination</i>
ct	<i>Cycle threshold</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>
DAG	Diacylglycerin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	Doppeltnegativ
DNA	<i>Desoxyribonukleic acid</i>
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DP	Doppeltpositiv
DRP1	<i>Dynamin-related Protein-1</i>
DTT	Dithiothreitol
EAE	Experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF-Zelle	Embryonale Fütterzelle
EFO (EF1 usw.)	Embryonale Fütterzellen der Generation 0 (1 usw.)
eGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Erk	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
ERM-Proteine	Ezrin/Radixin/Moesin-Proteine
ES-Zelle	Embryonale Stammzelle
<i>et al.</i>	<i>Et alii</i>
ETF-Q-DH	Elektronen-transferierendes-Flavoprotein-Ubichinon-Dehydrogenase
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FAD/FADH <sub>2</sub>	Flavinadenindinukleotid (oxidierte/reduzierte Form)
FAM	6-Carboxyfluorescein
Fc	<i>Fragment crystallisable</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
FIS1	<i>Mitochondrial fission protein 1</i>
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FLP	Benannt nach Flippase-Aktivität in Hefen
Foxp3	<i>Forkhead-box-protein 3</i>
FPP	Feuerpolierte Pasteurpipette

---



---

FRT	<i>FLP-recombinase target</i>
GATA3	<i>GATA-binding protein 3</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
gMFI	Geometrisches Mittel der Fluoreszenzintensität
GPDH	Glycerolphosphat-Dehydrogenase
HA	<i>Hyaluronic acid</i>
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HMWHA	<i>High molecular weight hyaluronic acid</i>
HPRT	Hypoxantin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMM	Innere mitochondriale Membran
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
IRES	Interne ribosomale Eintrittsstelle
IS	Immunologische Synapse
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
KG	Körpergewicht
KI	<i>Knock-in</i>
KO	<i>Knock-out</i>
LAT	<i>Linker of activated T cells</i>
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LCK	<i>Lymphocyte-specific protein tyrosin kinase</i>
LFA-1	<i>lymphocyte function-associated antigen 1</i>
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
LIP	Lymphopenie-induzierte Proliferation
LMWHA	<i>Low molecular weight hyaluronic acid</i>
<i>loxP</i>	<i>Locus of cross over (x) in P1</i>
LP	<i>Long pass</i> (Filter, Durchflusssytmetrie)
LPS	Lipopolysaccharid
LR	Leserahmen
LYVE1	<i>Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1</i>
M	Arithmetisches Mittel
MACS	<i>Magnetic (activated) cell separation/sorting</i>
MEF-Zelle	Mitomycin C-behandelte embryonale Fütterzelle
mH-Ag	<i>Minor histocompatibility antigen</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MMC	Mitomycin C
MMP-9	Matrixmetalloproteinase-9
MP	<i>Memory phenotype</i>
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
mROS	<i>Mitochondrial reactive oxygen species</i>
n.s.	Nicht signifikant ( $p > 0,05$ )
NAD <sup>+</sup> /NADH	Nicotinamidadenindinukleoid (oxidierte/reduzierte Form)
NANOG	<i>Abgeleitet von „Tir na nOg“ (Land der ewigen Jugend)</i>
Neo <sup>r</sup>	Neomycin- und Gentamycinresistenzgen
NF-κB	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T cells</i>
OKT 3/4	<i>Octamer binding transcription factor 3/4</i>
OMM	<i>Outer mitochondrial membrane</i>
OPN	Osteopontin
PB	Pacific blue
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>

---

---

PDH	Pyruvat-Dehydrogenase
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll
PI3K	Phosphoinosid-3-Kinase
PIP <sub>2</sub>	Phosphoinositol-4,5-bisphosphat
PKC $\theta$	Proteinkinase C $\theta$
PLC $\gamma$ 1	Phosphoinosidphospholipase C $\gamma$ 1
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PS	Penicillin/Streptomycin
pSMAC	<i>Periferal supramolecular activation cluster</i>
PTK	Proteintyrosinkinase
PTP	Proteintyrosinphosphatasen
Q/QH <sub>2</sub>	Ubichinon/Ubichinol
qRT-PCR	<i>Quantitative real-time polymerase chain reaction</i>
R26	<i>Rosa26</i>
Rag	<i>Recombination activating gene</i>
RET	Reverser Elektronentransport
RHAMM	Receptor of <i>HA-mediated motility</i>
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
ROR $\gamma$ t	<i>RAR-related orphan receptor-<math>\gamma</math>t</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
RT	Raumtemperatur
SEM	Standardfehler ( <i>standard error of the mean</i> )
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SLP-76	<i>SH2 domain containing leukocyte protein of 76 kDa</i>
SOX-2	<i>Sex determining region Y-box 2</i>
SP	<i>Short pass</i> (Filter, Durchflussszytometrie)
SSC	<i>Side scatter</i> ( <i>Durchflussszytometrie</i> )
SSC-Puffer	<i>Saline-sodium Puffer</i>
SSEA	<i>Stage-specific embryonic antigen</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription protein</i>
STIM	<i>Stromal interaction molecule</i>
T-bet	<i>T-box transcription factor expressed in T cells</i>
TAMRA	Tetramethylrhodamine
TCAIM	<i>T cell activation inhibitor</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor-<math>\beta</math></i>
T <sub>H</sub> -Zellen	T-Helferzellen
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TOAG-1	<i>Tolerance-associated gene-1</i>
TRAF6	<i>TNF receptor associated factor 6</i>
Treg	Regulatorische T-Zelle
TSG6	<i>TNF-stimulated gene 6</i>
TZR	T-Zellrezeptor
ÜN	Über Nacht
wt	Wildtypisch
ZAP-70	<i>Zeta-chain associated protein kinase 70</i>
ZLM	Zellademedium
$\alpha$	Anti
7AAD	7-Aminoactinomycin
$\alpha$ KGDH	$\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase

---

## ABKÜRZUNGEN FÜR VERWENDETE PHYSIKALISCHE GRÖßEN

---

°C	Grad Celcius
Ci	Curie
cps	<i>Counts per second</i>
Da	Dalton
g	Gramm
h	Stunden
l	Liter
M	Molar (mol/l)
min	Minuten
mol	Stoffmenge von 12 g <sup>12</sup> C
Rpm	Umdrehungen/Minute (rounds per minute)
W	Watt

---

## ABKÜRZUNGEN FÜR EINHEITENVORSÄTZE

---

k	kilo (10 <sup>3</sup> )
M	milli (10 <sup>-3</sup> )
μ	mikro (10 <sup>-6</sup> )
n	nano (10 <sup>-9</sup> )

---



## 1 ALLGEMEINE EINLEITUNG

Die Aufgabe des Immunsystems ist es, den Organismus vor pathogenen, körperfremden Keimen und transformierten, körpereigenen Zellen zu schützen. Das Immunsystem besteht aus lymphatischen Organen, Zellen und löslichen Komponenten, die in der Lage sind körpereigene Strukturen von körperfremden (und z.T. transformierten) zu unterscheiden. Seine Bestandteile können in angeborene oder adaptive Komponenten unterschieden werden. Der angeborene Teil des Immunsystems wird als erste Verteidigungslinie gegen Mikroorganismen in der Kontrolle von Infektionen gesehen, wobei die Effektorfunktionen unmittelbar und in voller Wirksamkeit zum Tragen kommen. Neben Barriere-Mechanismen von Epithelien (pH, Zilien, normale mikrobielle Flora) umfasst das angeborene Immunsystem humorale Bestandteile (wie Lysozym und Komplementsystem) und zelluläre Bestandteile (wie dendritische Zellen, Makrophagen, natürliche Killerzellen und Granulozyten) [1, 2].

Die Effektorfunktionen des adaptiven Immunsystems erreichen erst mit einer Latenz von einigen Tagen ihre volle Ausprägung. Adaptive Immunantworten führen meist zur Bildung eines immunologischen Gedächtnisses, welches den Organismus vor der Neuinfektion mit demselben Pathogen schützt. Die Bildung eines immunologischen Gedächtnisses und die sich im Laufe der Immunantwort steigernde Spezifität zählen zu den charakteristischen Eigenschaften des adaptiven Immunsystems. Zu den zellulären Komponenten des adaptiven Immunsystems gehören T- und B-Zellen. Antikörper hingegen sind humorale Bestandteile. Angeborenes und adaptives Immunsystem sind über viele Mechanismen miteinander verknüpft [1, 2].

Hämatopoetische Stammzellen sind die Vorläuferzellen von allen Immunzellen, somit auch von T-Zellen. T-Zellvorläufer wandern vom Knochenmark über das Blut in den Thymus ein und reifen hier zu zwei Hauptklassen der T-Zellen, solche die den  $\alpha\beta$ -T-Zellrezeptor (TZR) tragen und solche die den  $\gamma\delta$ -TZR tragen. Erstgenannte unterteilt man weiter in  $CD8^+$  und  $CD4^+$  T-Zellen. Der TZR erkennt Antigene als Peptide im Komplex mit MHC-Molekülen (*major histocompatibility complex*). Peptidbeladene MHC-Moleküle der Klasse I werden durch  $CD8^+$  T-Zellen erkannt, solche der Klasse II durch  $CD4^+$  T-Zellen. Bei Molekülen der Klasse III handelt es sich hauptsächlich um Proteine, die an der angeborenen Immunität beteiligt sind. MHC-Moleküle der Klasse I werden von fast allen Zellen exprimiert, Klasse II-Moleküle nur von sogenannten professionellen Antigen-präsentierenden Zellen. Dazu zählen dendritische Zellen, Monozyten und B-Zellen [1, 2].

### 1.1 T-ZELLAKTIVIERUNG

Nehmen dendritische Zellen körperfremde Peptide auf, werden diese prozessiert und auf der Oberfläche im MHC-Kontext präsentiert. Die Erkennung von Pathogenen durch Muster-Erkennungsrezeptoren und ein inflammatorisches Milieu lassen dendritische Zellen reifen, sodass sie T-Zellen in lymphatischen Geweben aktivieren können. Während  $CD4^+$  T-Zellen direkt durch dendritische Zellen aktiviert werden, benötigen  $CD8^+$  T-Zellen zusätzlich die Hilfe von  $CD4^+$  T-Zellen [1].

Zur T-Zellaktivierung sind vor allem zwei Signale ausschlaggebend. Das erste Signal wird über die Erkennung des MHC/Peptid-Komplex durch den TZR vermittelt. Darüber hinaus werden im Verlauf einer Infektion kostimulatorische Moleküle ( $CD80/CD86$ ) auf Antigen-

präsentierenden Zellen induziert, die über die Bindung an CD28 auf T-Zellen das zweite Signal vermitteln. Eine wichtige Folge der T-Zellaktivierung ist die Bildung von IL-2, welches als Wachstumsfaktor die klonale Expansion der T-Zellen auslöst [2]. Die Kontaktstelle zwischen T-Zelle und Antigen-präsentierenden Zelle kann sich während der Zellaktivierung zu einer immunologischen Synapse (IS) entwickeln. Sie besitzt eine spezielle Zusammensetzung und Ordnung, die sich aber während der Aktivierung ändern kann und sich auch von Zelltyp zu Zelltyp unterscheidet [zur detaillierten Übersicht siehe 3, 4]. Die Signaltransduktion nach Ligation des TZR mit dem Peptid/MHC-Komplex ist ein komplexer Vorgang und kann deshalb nur unvollständig, und mit dem Fokus auf die für diese Arbeit relevanten Interaktionen, beschrieben werden [zur detaillierten Übersicht siehe 5].

Einer der ersten Schritte ist die Aktivierung von Tyrosinkinasen, wie LCK (*lymphocyte-specific protein tyrosin kinase*) und ZAP-70 (*zeta-chain associated protein kinase-70*). Eine Konformationsänderung im CD3 $\epsilon$ -Komplex und den  $\zeta$ -Ketten macht Tyrosinreste von ITAM-Motiven (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) des CD3-Komplexes für eine Phosphorylierung durch LCK und Fyn zugänglich. ZAP-70 bindet an phosphorylierte ITAM-Motive der  $\zeta$ -Kette, wird selbst von LCK phosphoryliert und leitet daraufhin eine Reihe weiterer Phosphorylierungen ein. Zu den Zielproteinen gehören u.a. LAT (*linker of activated T cells*) und SLP-76 (*SH2 domain containing leukocyte protein of 76 kDa*). Nebst anderen, kann nun die Phospholipase C- $\gamma$ 1 (PLC $\gamma$ 1) an LAT binden. So kommt es zur Bildung eines großen Proteinkomplexes, dessen Stabilität sich erst durch die Bindung der einzelnen Komponenten ergibt (Abb. 1-1 A) [5].

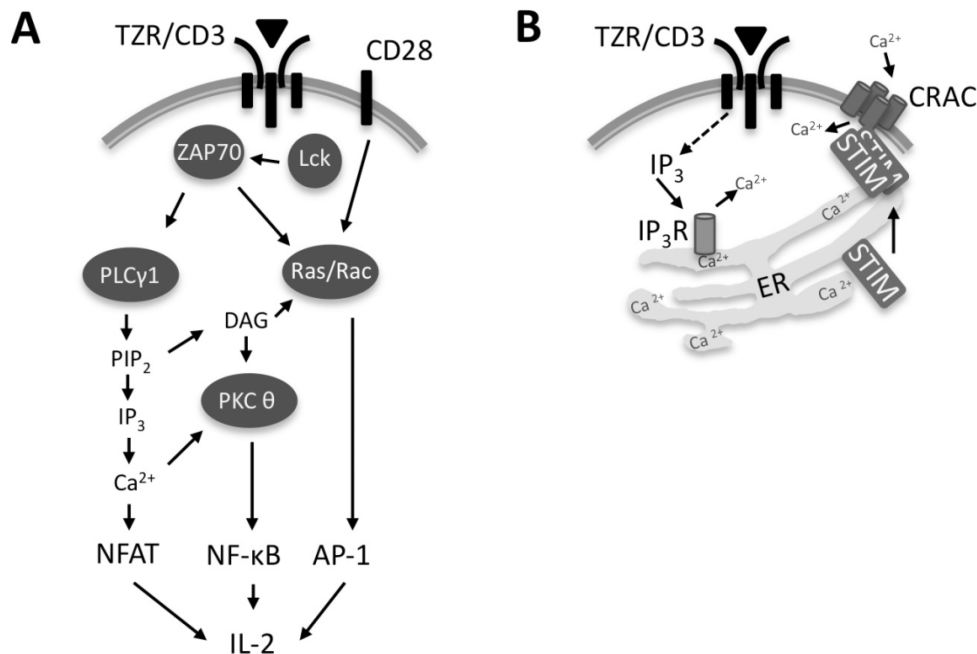
Ras- und Rac-abhängige Signalwege führen zur Aktivierung von AP-1 (*activator protein 1*). Die Aktivierung von PLC $\gamma$ 1 führt durch die Spaltung von Phosphoinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zur Bildung der Botenstoffe Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerin (DAG). Ein durch DAG (und Kalzium) ausgelöster Signalweg führt über die Proteinkinase C  $\theta$  (PKC $\theta$ ) zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*; Abb. 1-1 A) [5].

IP<sub>3</sub> stimuliert die Öffnung der Kalziumkanäle im endoplasmatischen Retikulum (ER). Deren Entleerung führt über STIM (*stromal interaction molecule*) zur Öffnung von CRAC (*calcium-release activated calcium*) Kanälen in der Plasmamembran (Abb. 1-1 B). Dies führt zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration und infolgedessen u.a. zur Aktivierung von NFAT (*nuclear factor of activated T cells*; Abb. 1-1 B) [5].

CD28 ist eines der wesentlichen kostimulatorischen Moleküle und vermittelt das sogenannte „zweite Signal“. Phosphoinositol-3-Kinase, IL-2 induzierbare T-Zellkinase, AKT und VAV1 sind Schlüsselmoleküle der Effektorfunktionen von CD28 und verstärken die durch den TZR ausgelösten Signalkaskaden. Obwohl CD28 eines der wichtigsten kostimulatorischen Moleküle ist, führt seine Defizienz nicht zum absoluten Verlust aller Immunantworten. Dies ist ein Hinweis dafür, dass viele Funktionen durch andere kostimulatorische Moleküle kompensiert werden können, und dass die CD28-Signaltransduktion eher quantitativ als qualitativ wirkt. Das heißt, bereits ausgelöste Signale werden verstärkt, jedoch keine einzigartigen Signale hinzugefügt [zusammengefasst durch 6].

Die initiale Signaltransduktion in T-Zellen resultiert in der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFAT, NF- $\kappa$ B und AP-1. Diese Moleküle sind für viele der wichtigsten Folgen der T-Zellaktivierung, wie beispielsweise der Expression und Sekretion des T-

Zellwachstumsfaktors IL-2, essenziell. Darüber hinaus wurden sie alle als Zielproteine mitochondrialer reaktiver Sauerstoffspezies beschrieben [zusammengefasst durch 7].



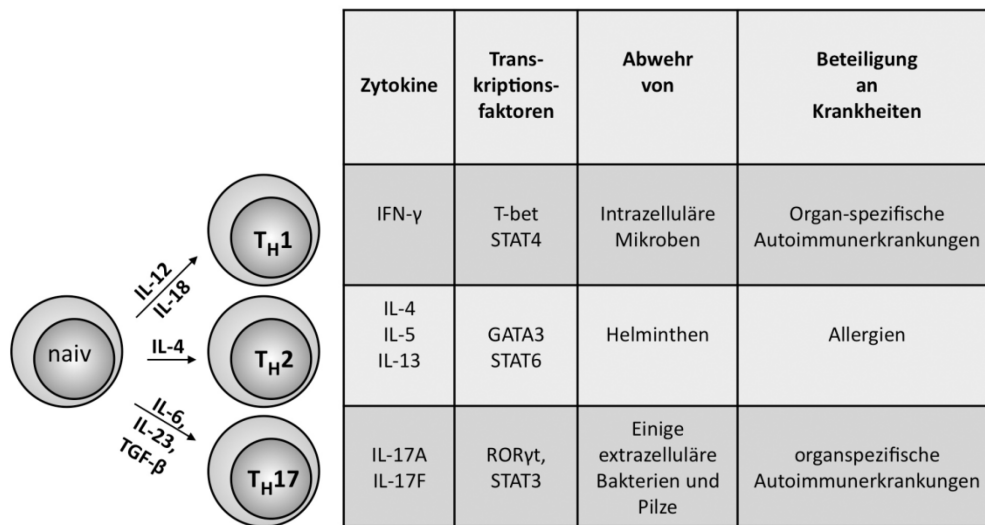
**Abbildung 1- 1. Signaltransduktion während der T-Zellaktivierung** [Abbildung adaptiert und modifiziert nach 1, 5]. **A** Ereignisse nach TZR-Ligation, die zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFAT, NF-κB und AP-1 und infolgedessen zur Bildung von IL-2 führen. **B** Kalziumeinstrom vermittelt durch IP<sub>3</sub>.

## 1.2 BILDUNG VON T-HELPERZELLEN

Die Aktivierung von T-Zellen führt zur Reifung von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu T-Helferzellen (T<sub>H</sub>-Zellen) bzw. zytotoxischen T-Zellen und zur Entwicklung ihrer Effektormechanismen. Erstgenannte werden im folgenden Abschnitt detaillierter beschrieben.

T<sub>H</sub>-Zellen spielen eine essenzielle Rolle für die Aktivierung des adaptiven Immunsystems und dessen Ausprägung in der Abwehr unterschiedlicher Erreger. Hierbei interagieren sie beispielsweise mit B-Zellen was zum Klassenwechsel der Antikörper und deren Affinitätsreifung führt, aktivieren und rekrutieren CD8<sup>+</sup> T-Zellen, Makrophagen und Granulozyten [zur detaillierten Zusammenfassung siehe 8].

Die Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen führt zu deren Differenzierung in verschiedene Subtypen und wird durch die Ausschüttung unterschiedlicher Zytokine vor allem durch Antigen-präsentierende Zellen vorangetrieben (Abb. 1-2). Aber auch andere Faktoren wie die Natur des Antigens, seine Dosis und die Affinität des TZR können modulierend wirken [1]. Nach der Entdeckung von T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen durch Mosmann *et al.* wurden bis heute viele weitere T<sub>H</sub>-Subpopulationen beschrieben, wie beispielsweise T<sub>H</sub>17-, T<sub>H</sub>9-, folliculäre T<sub>H</sub>-Zellen und regulatorische T-Zellen [8–10], die sich alle durch ein besonderes Zytokinspektrum und spezielle Transkriptionsfaktoren auszeichnen (für ausgewählte Subpopulationen in Abb. 1-2 dargestellt). Sezernierte Zytokine wirken oft positiv auf die Entwicklung der jeweiligen Subpopulation zurück oder inhibieren die Differenzierung anderer Subpopulationen [11]. Im Folgenden werden einige Subpopulationen genauer beschrieben.



**Abbildung 1- 2. Differenzierung und Eigenschaften von TH1-, TH2- und TH17-Zellen** [Abbildung adaptiert und modifiziert nach 11].

### TH1- UND TH2-ZELLEN

TH1-Zellen differenzieren sich in Anwesenheit von Interleukin (IL)-12, welches hauptsächlich durch dendritische Zellen und Makrophagen sezerniert wird. Sie sind durch die Expression der Transkriptionsfaktoren T-bet (*T-box transcription factor expressed in T cells*) und STAT4 (*Signal transducers and activators of transcription 4*) sowie der Sekretion von Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) charakterisiert. Eine TH1-Antwort führt zur Aktivierung von Makrophagen aber auch B-Zellen, die zur Bildung opsonisierender Antikörper angeregt werden. Dies trägt zur Beseitigung von intrazellulären Erregern durch eine eher Zell-vermittelte Immunantwort bei. Im Gegensatz dazu differenzieren sich TH2-Zellen in Anwesenheit von IL-4 und sezernieren infolgedessen auch selbst IL-4. Darüber hinaus exprimieren sie aber auch IL-5 und IL-13 sowie die Transkriptionsfaktoren STAT6 und GATA3 (*GATA-binding protein 3*). Im Gegensatz zu TH1-Zellen können sie B-Zellen wesentlich effektiver aktivieren, wodurch eine humorale Antwort dominiert (Produktion der Immunglobuline A und E). Dies, sowie die Rekrutierung von Eosinophilen, vermittelt eine Immunantwort gegen Helminthen. Einerseits kann die Immunantwort durch die unterschiedlichen Zytokinspektren von TH-Zellen geformt werden, andererseits bilden sie auch die Grundlage für die unterschiedliche Ausprägung von Krankheiten. So sind TH1-Zellen oft mit organspezifischen Autoimmunkrankheiten assoziiert, TH2-Zellen dagegen mit allergischen Reaktionen [8].

### TH17-ZELLEN

TH17-Zellen wurden erstmals 2005 als eigene Subpopulation definiert [12, 13]. Sie exprimieren den Transkriptionsfaktor ROR $\gamma$ t (*RAR-related orphan receptor  $\gamma$  t*) und sezernieren die namensgebenden Effektorzytokine IL-17A und IL-17F. Es konnte gezeigt werden, dass einige extrazelluläre Bakterien (*Klebsiella pneumoniae* und *Citrobacter rodentium*) und Pilze (*Candida albicans*) eine TH17-Antwort hervorrufen können. Krankheiten wie multiple Sklerose, rheumatoide Arthritis und Psoriasis gingen mit einem erhöhten IL-17 Level einher [zusammengefasst durch 14].



IL-17 wirkt pleiotrop, beispielsweise fördert es die Expansion von myeloiden Zellen und rekrutiert neutrophile Granulozyten [15, 16]. Die IL-17-Sekretion ist nicht auf T<sub>H</sub>17-Zellen beschränkt. Weitere Produzenten sind  $\gamma\delta$ -T-Zellen, natürliche Killerzellen, natürliche Killer-T-Zellen, neutrophile und eosinophile Granulozyten [17]. Die Differenzierung von T<sub>H</sub>17-Zellen wird durch die Zytokine IL-6, IL-23 und TGF- $\beta$  (*transforming growth factor*- $\beta$ ) gefördert. TGF- $\beta$  begünstigt auch die Bildung von induzierten regulatorischen T-Zellen (s.u.), was jedoch durch das proinflammatorische Milieu, das für die Differenzierung von T<sub>H</sub>17-Zellen nötig ist, unterdrückt wird [zusammengefasst durch 17].

Die Abhängigkeit vom umgebenden Milieu und die überlappende Funktion von Differenzierungszytokinen verdeutlicht die Plastizität von T<sub>H</sub>-Subpopulationen. Das heißt, die Differenzierung ist kein starres Programm und es ist möglich, dass sich Subpopulationen zu anderen differenzieren. Im Gegensatz zu T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2- scheinen T<sub>H</sub>17-Zellen eine höhere Plastizität zu besitzen [8]. Obwohl die Zytokine der einen Subpopulation die jeweils andere hemmen, sind *in vivo* oft gemischte Immunreaktionen zu detektieren [1, 14]. Die Existenz von IFN- $\gamma$ /IL-17-Koproduzenten *in vivo* unterstützt die Vermutung, dass eine Differenzierung von T<sub>H</sub>17- zu T<sub>H</sub>1-Zellen möglich ist und eine T<sub>H</sub>17 Antwort daher in eine T<sub>H</sub>1 Antwort münden könnte [14]. Gemischte T<sub>H</sub>-Subpopulationen während einer Immunantwort weisen darauf hin, dass nicht nur das Zytokinmilieu, sondern auch weitere Faktoren beteiligt sind, wie Antigenpräsentation und TZR-Affinität. Gerade letzteres spiegelt sich in der Vielfalt der Peptid/MHC-Komplexe wider, die während einer Immunantwort gebildet und mit unterschiedlicher Affinität erkannt werden können [1].

### REGULATORISCHE T-ZELLEN (T<sub>REGS</sub>)

Neben T<sub>H</sub>-Zellen mit proinflammatorischen Eigenschaften gibt es auch mehrere inhibitorische Subpopulationen. Unter diesen bilden regulatorische T-Zellen (T<sub>Reg</sub>s) die bekannteste T<sub>H</sub>-Zellpopulation. Mit der Fähigkeit das Immunsystem zu supprimieren und Immunantworten zu terminieren spielen sie eine essenzielle Rolle in der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz. Suppressiv Mechanismen können über Zell-Zell-Kontakt aber auch lösliche Faktoren wie beispielsweise Zytokine, Ektoenzyme, Granzym und Perforin vermittelt werden [18]. T<sub>Reg</sub>s sind innerhalb der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellpopulation angereichert [19]. Da jedoch auch konventionelle T-Zellen während ihrer Aktivierung CD25 exprimieren, konnte erst die Entdeckung des Linienmarkers Foxp3 diese Zellpopulation von anderen abgrenzen [20–22]. Mehrere Arbeiten zeigten, dass die Foxp3-Expression auf T<sub>Reg</sub>s limitiert ist [zusammengefasst in 18]. Dies unterstützt die Tatsache, dass CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen suppressive Eigenschaften aufweisen [23].

Man unterscheidet sogenannte natürliche T<sub>Reg</sub>s, die bereits im Thymus gebildet werden und solche, die in der Peripherie induziert werden (induzierte T<sub>Reg</sub>s). Helios, ein Transkriptionsfaktor aus der Familie der Ikarus-Proteine, wurde als Marker für natürliche T<sub>Reg</sub>s beschrieben [24]. Die Abgrenzung beider Populationen durch diesen Marker wird allerdings kontrovers diskutiert [25].

### 1.3 BILDUNG VON GEDÄCHTNIS-T-ZELLEN

Eine der wichtigsten Funktionen des adaptiven Immunsystems ist die Bildung von Gedächtnis-T-Zellen. Diese Zellen können bei einem zweiten Kontakt mit demselben Antigen

sehr schnell eine Immunantwort vermitteln. Sie entwickeln sich aus Zellen, die aus der klonalen Expansion hervorgehen. Gedächtnis-T-Zellen müssen bei einem zweiten Kontakt mit demselben Antigen nicht zuvor durch dendritische Zellen aktiviert werden und sind nicht vom kostimulatorischen Signal abhängig [2, 26].

Für die Konversion von naiven zu Gedächtnis-T-Zellen, sowie deren Überleben sind Zytokine wie IL-7 und IL-15 essenziell. Während IL-7 eher das Überlebenssignal vermittelt, ist IL-15 an der Proliferation der Zellen beteiligt [zusammengefasst in 27].

Ein allgemein akzeptiertes Modell beschreibt eine „Arbeitsteilung“ zwischen unterschiedlichen Gedächtnis-T-Zellsubpopulationen. Diese unterscheiden sich in mehreren Punkten wie der Lokalisation, der Proliferationskapazität, der Zytokinsekretion und des Potentials zur Aktivierung anderer Zellen [28]. Man unterscheidet zentrale und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen, es gibt allerdings noch weitere Subpopulationen [29]. Zentrale Gedächtnis-T-Zellen ähneln hinsichtlich der Expression von C-C-Chemokin-Rezeptor Typ 7 (CCR7) und CD62L naiven Zellen [28]. Sowohl CCR7 als auch CD62L sind an der Migration von naiven Zellen aus dem Blut über spezielle hohe Endothelzellen in sekundäre lymphatische Organe beteiligt [1]. Im Gegensatz zu naiven Zellen weisen humane Gedächtnis-T-Zellen eine geringe CD45RA-Expression auf. Zentrale Gedächtnis-T-Zellen haben eine große Proliferationskapazität und sezernieren in der ersten Phase hohe Mengen an IL-2 [28].

Effektor-Gedächtnis-T-Zellen exprimieren kaum CD62L und CCR7 auf ihrer Oberfläche. Je nach Entzündungsherd und Erreger zeigen sie spezifische Marker, die ihnen die Migration zu den entsprechenden Orten erlauben. Verglichen mit zentralen Gedächtnis-T-Zellen kommt es bei Effektor-Gedächtnis-T-Zellen zu einer starken Ausschüttung von Effektorzytokinen bei erneutem Antigen-Kontakt, haben jedoch eine geringere Proliferationskapazität [28].

Murine und humane T-Zellen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Expression von Gedächtnismarkern und das gängige Modell wurde zunächst für humane Gedächtnis-T-Zellen definiert. Für murine Zellen wird die Unterscheidung zwischen zentralen und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen zwar ebenfalls genutzt [30–32], jedoch ist es umstritten, ob die beiden unterschiedlichen Gedächtnis-T-Zellpopulationen getrennte zelluläre Linien darstellen. [33–36]. Auch die Unterscheidung hinsichtlich der Zytokinausschüttung und der zytotoxischen Eigenschaften anhand der CCR7-Expression ist umstritten [37].

Im murinen System dienen eher CD62L und CD44 zur Unterscheidung der beiden Populationen [30]. CD44 ist auf naiven Zellen schwach exprimiert, wird im Zuge der T-Zellaktivierung schnell hochreguliert und bleibt auch nach der Immunantwort auf der Zelloberfläche erhalten. Es zeigt somit einen vorangegangenen Antigen-Kontakt an [38]. Deshalb ist es nicht möglich zwischen aktivierten und Gedächtnis-T-Zellen zu unterscheiden [38]. CD62L ist in naiven Zellen stark exprimiert, wird aber im Zuge der Aktivierung herunterreguliert. In zentralen Gedächtnis-T-Zellen kommt es zur Reexpression dieses Markers. Für eine detaillierte Erläuterung der unterschiedlichen Prozesse, in die CD44 eingebunden ist, siehe Abschnitt 3.1.

## 1.4 TRANSPLANTATION

Die Transplantation, das heißt der künstliche Transfer von Zellen oder Geweben zwischen Individuen, ist oftmals die letztmögliche medizinische Therapie bei irreversibel geschädigten oder erkrankten Organen. Die Abstoßung der transplantierten Organe ist dabei eine Hauptkomplikation. Ausgelöst wird sie durch eine Immunantwort gegen Antigene im

Transplantat, die als fremd erkannt werden. Findet ein Transfer von Zellen oder Geweben zwischen Individuen derselben Art statt, spricht man von einer Alloantwort des Immunsystems, bei einer Übertragung zwischen verschiedenen Spezies von einer Xenoantwort. Eine autologe Transplantation oder eine Transplantation zwischen genetisch identischen Individuen führt nicht zu einer Immunantwort, das Gewebe ist kompatibel [39].

Alloantigene sind Proteine, die sich von Individuum zu Individuum einer Spezies unterscheiden. Dies könnte theoretisch alle Proteine mit Polymorphismen umfassen. Alloantigene lassen sich in MHC- und mH- (*minor histocompatibility*) Antigene unterscheiden, wobei erstgenannte die stärksten Reaktionen auslösen [39]. Das Transplantatüberleben kann bei zunehmender MHC-Ähnlichkeit zwischen Empfänger und Spender erhöht werden. Da, mit Ausnahme von eineiigen Zwillingen, eine komplette MHC-Übereinstimmung fast nie gewährleistet werden kann und zudem noch mH-Antigene eine Rolle spielen, ist der Erfolg einer Transplantation an eine wirksame immunsuppressive Therapie gebunden [1].

Histologisch werden drei Muster der Abstoßung unterschieden. Eine hyperakute Abstoßung wird durch bereits existierende Alloantikörper gegen den Spender initiiert, die beispielsweise während einer vorhergehenden Transplantation oder Bluttransfusion gebildet wurden. Reagieren diese Antikörper mit dem Endothel des vaskularisierten Organs, kommt es sehr schnell zu einer Transplantatabstoßung [1]. Diese wird durch die Aktivierung des Komplementsystems hervorgerufen, was zur Schädigung der Gefäße durch Granulozyten und zum Gefäßverschluss durch die Aggregation von Thrombozyten führt [11, 40]. Eine akute Abstoßung findet im Zeitraum von fünf Tagen bis drei Monaten nach der Transplantation statt. Man kann die akute Abstoßung in zellulär und Antikörper-vermittelt unterteilen, jedoch tritt beides meist gleichzeitig auf [11]. Die akute zelluläre Abstoßung ist gekennzeichnet durch eine massive Einwanderung von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in das Transplantat und der Gewebszerstörung durch zytotoxische T-Zellen. Vaskuläre Rejektionen sind dagegen oft durch die Einwanderung von Makrophagen geprägt [39]. Die Bildung von Alloantikörpern führt zur akuten Antikörper-vermittelten Abstoßung und äußert sich in der Schädigung von Gefäßen durch Komplementaktivierung, Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Gefäßverschluss. Immunsuppressiva haben das 1-Jahr-Transplantatüberleben stark verbessert. Bedingt durch eine chronische Abstoßung veränderte sich die Langzeitprognose jedoch kaum. Wichtige Ursachen für eine chronische Abstoßung sind langsame alloreaktive Immunantworten, Ischämie-Reperfusionsschäden, Schäden durch die Immunsuppressiva und virale Komplikationen [1]. Ein charakteristisches Zeichen von chronischer Abstoßung ist eine Vaskulopathie, das heißt eine Fibrosierung und Verengung der Gefäßwände.

## 1.5 ROLLE VON T-ZELLEN WÄHREND DER TRANSPLANTATION

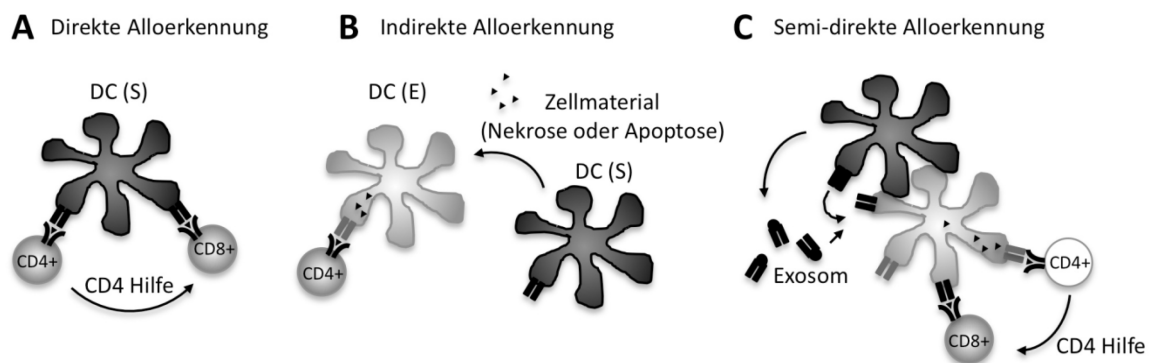
T-Zellen spielen eine zentrale Rolle in Immunantworten bei Abstoßungsprozessen. Es gibt grundsätzlich drei unterschiedliche Möglichkeiten für T-Zellen Alloantigene zu erkennen (Abb. 1-3) [gemäß 39]. Von direkter Alloantigen-Erkennung spricht man, wenn Antigen-präsentierende Zellen aus dem transplantierten Organ in Lymphknoten migrieren und dort T-Zellen aktivieren (Abb. 1-3 A). Ein Hinweis für deren physiologische Relevanz zeigt sich darin, dass Gewebe, das von dendritischen Zellen gereinigt wurde, langsamer abgestoßen

wird [41]. MHC- und Peptid/MHC-Komplexe des Spenders werden als fremd erkannt und können somit  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen des Empfängers aktivieren.

Eine indirekte Erkennung liegt vor, wenn allogene Proteine von Antigen-präsentierenden Zellen des Empfängers prozessiert und anschließend T-Zellen des Empfängers präsentiert werden (Abb. 1-3 B). Dieser Mechanismus aktiviert  $CD4^+$  T-Zellen, da exogene Antigene im MHC-II-Kontext präsentiert werden [39]. Durch Kreuzpräsentation können allerdings auch  $CD8^+$  T-Zellen aktiviert werden [42].

Die semi-direkte Alloantigen-Erkennung bezeichnet einen Vorgang bei dem dendritische Zellen allogene Peptid/MHC-Komplexe aufnehmen [43]. Dies kann direkt durch Zell-Zell-Kontakt oder über die Aufnahme von Exosomen, die MHC-Moleküle enthalten, geschehen (Abb. 1-3 C) [39].

Reaktionen, die sich früh nach der Transplantation manifestieren, sind auf eine direkte Erkennung zurückzuführen. Reaktionen infolge einer indirekten Erkennung kommen, auf Grund der benötigten Prozessierungszeit, erst später zum Tragen.



**Abbildung 1- 3. Mechanismen der Alloantigen-Erkennung** [Abbildung adaptiert nach 39]. **A** Direkte Alloantigen-Erkennung:  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen erkennen MHC-Moleküle auf dendritischen Zellen (DC) des Spenders (S) als fremd. **B** Indirekte Alloantigen-Erkennung: Alloantigene werden aus nekrotischem oder apoptotischem Material des Transplantats von dendritischen Zellen des Empfängers (E) aufgenommen, prozessiert und  $CD4^+$  T-Zellen präsentiert. **C** Semi-direkte Alloantigen-Erkennung: Transfer von intakten MHC-Molekülen von Spender- zu Empfänger dendritischen Zellen über verschiedene Wege (Aufnahme durch Exosomen, direkter Transfer durch Zell-Zell-Kontakt).

Wie in Abbildung 1-3 illustriert, spielen sowohl  $CD4^+$  als auch  $CD8^+$  T-Zellen eine Rolle während der Transplantatabstoßung. Dabei sind  $CD4^+$  T-Zellen essenziell für die Abstoßung, während  $CD8^+$  T-Zellen nicht in allen Modellen unabhängig von  $CD4^+$  T-Zellen eine Abstoßung vermitteln können [39]. Zahlreiche Publikationen weisen auf die Beteiligung unterschiedlicher  $T_H$ -Zellpopulationen in der Transplantatabstoßung hin.  $T_H1$ -Zellen induzieren eine Makrophagen-vermittelte verzögerte Hypersensitivitätsreaktion, stimulieren B-Zellen zur Antikörperproduktion und wirken aktiv zellschädigend durch Fas/Fas-Ligand-vermittelte Zytotoxizität [10]. Seit ihrer Beschreibung unterstützten viele Publikationen den Beitrag von  $T_H17$ -Zellen zur allogenen Abstoßung [10, 44], wobei viele Effektormechanismen durch IL-17 vermittelt werden (vgl.  $T_H$ -Zellen in Abschnitt 1.2).

Neben diesen beiden  $T_H$ -Zellpopulationen sind auch  $T_H2$ -Zellen in Abstoßungsprozesse involviert und es gibt Hinweise auf Beteiligung von weiteren Subpopulationen. Ebenso wie auf den Beitrag von regulatorischen T-Zellen zur Suppression von Alloantworten soll im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter darauf eingegangen werden [10].

*In vitro* kann die Reaktion von alloreaktiven T-Zellen gegen fremde MHC-Moleküle durch die Kokultur von Zellen des Spenders und des Empfängers imitiert werden. Die meisten Experimente, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, basieren auf diesem Prinzip (Prinzip und detailliertes Protokoll unter 5.6.2).

## 1.6 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Der Grad der T-Zellaktivierung und die Art der T-Zelldifferenzierung kann durch viele Signale beeinflusst werden. Neben extrazellulären Faktoren, formen unterschiedliche intrazelluläre Signale die T-Zellaktivierung und -differenzierung. In diesem Zusammenhang gewinnen Mitochondrien als Orte zur Energiegewinnung und für Enzyme zentraler Stoffwechselwege eine immer größere Bedeutung. Die Signaltransduktion im Zuge der Zellaktivierung beeinflusst den Metabolismus und die Differenzierung von T-Zellen [45, 46]. Umgekehrt können auch Signale ausgehend von Mitochondrien, die T-Zellaktivierung kontrollieren.

Mitochondriale reaktive Sauerstoffspezies als Nebenprodukte der Zellatmung beeinflussen die Aktivität und Struktur zellulärer Komponenten. Lange Zeit stand ausschließlich ihre zellschädigende Wirkung und deren Bedeutung für Altersprozesse im Vordergrund [47]. Neuere Arbeiten weisen vor allem auf ihre Fähigkeit hin, die Enzymaktivität positiv zu beeinflussen und unterstreichen deren Bedeutung während der T-Zellaktivierung [7, 48]. Nicht zuletzt spielt die mitochondriale Lokalisation und die Fähigkeit als Kalziumpuffer zu fungieren eine große Rolle für die Aktivierung von T-Zellen [49, 50].

Zwar ist wenig über immunologische Aspekte bei Krankheiten mitochondrialen Ursprungs bekannt, dennoch konnten auch hier einige Studien eine verminderte T-Zellaktivierung oder eine erhöhte Infektanfälligkeit mit der Defizienz mitochondrialer Proteine in Verbindung bringen [51–53]. Diese Studien unterstützen die Bedeutung mitochondrialer Proteine während der T-Zellaktivierung.

Das mitochondriale Protein TCAIM (*T cell activation inhibitor, mitochondrial*) wurde erstmals bei der Suche nach Biomarkern zur Charakterisierung allogener Toleranz beschrieben [54]. Neben der differenziellen Regulation während der Abstoßung allogener Transplantate bzw. der Toleranzinduktion, deuteten einige Untersuchungen auf eine Rolle während der T-Zellaktivierung und -differenzierung hin, was Gegenstand des ersten Teils dieser Arbeit ist (detailliertere Einführung und spezifische Zielstellung in Kapitel 2).

Neben klassischen extrazellulären Signalen wie Kostimulation und TZR-Stimulation, die zur T-Zellaktivierung führen, sind für die Feinregulation und Differenzierung von T-Zellen viele weitere Mechanismen bedeutsam. Die Natur des Antigens, Stimulationsdauer, Affinität, Zytokine sowie nicht-klassische kostimulatorische Moleküle können den Grad der Aktivierung und die Differenzierung beeinflussen [55].

In diesem Zusammenhang ist der zweite Teil dieser Arbeit zu sehen, der sich mit dem Einfluss von CD44 auf die Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen beschäftigt (nähere Einführung und Zielstellung zu diesem Teil ab Kapitel 3). CD44 kann unter bestimmten Bedingungen eine kostimulatorische Funktion übernehmen.

Viele kostimulatorische Moleküle, wie auch CD28 führen zu einer Verstärkung der vom TZR- ausgehenden Signale [6]. Eine Phase-III-Studie zeigte, dass die Blockierung der CD28-vermittelten Signaltransduktion durch Belatacept bei Nierentransplantationen dosisabhängig zu einer höheren Anzahl akuter Abstoßungsepisoden führt [56]. Dies

verdeutlicht, dass sich die CD28-vermittelte Kostimulation kompensieren lässt, und unterstützt die Annahme, dass eine unterschiedliche Gewichtung der Signale durch andere kostimulatorische Moleküle die Art der T-Zelldifferenzierung lenken kann. Der zweite Abschnitt beschäftigt sich deshalb auch mit der Frage, welche T-Zellpopulationen von einer verminderten CD28-Kostimulation und TZR-Stimulation profitieren und welche alternativen kostimulatorischen Moleküle dabei eine Rolle spielen. Dies soll auch Erklärungsansätze für die erhöhte Frequenz akuter Abstoßungskrisen nach Verabreichung von Belatacept liefern.

## 2 INTRAZELLULÄRE SIGNALE WÄHREND DER T-ZELLAKTIVIERUNG UND -DIFFERENZIERUNG<sup>1</sup>

### 2.1 EINLEITUNG

#### 2.1.1 TCAIM (*T CELL ACTIVATION INHIBITOR, MITOCHONDRIAL*)

Auf dem Gebiet der Transplantationsmedizin konnten in den letzten 30 Jahren große Fortschritte in der Verlängerung der Transplantat-Überlebensrate erzielt werden. Dies ist vor allem auf die Entdeckung und Weiterentwicklung von Immunsuppressiva zurückzuführen. Eine Ursache, weshalb sich die Langzeitüberlebensrate der Transplantate nicht im gleichen Maß verbessert hat, ist auf deren Toxizität zurückzuführen [57].

Ein für die Bewertung der Funktion und das Überleben des Transplantats wesentlicher Aspekt ist der Immunstatus. Die Überwachung des Immunsystems (u. a. mittels geeigneter Biomarker) kann über folgende Aspekte Aufschluss geben [gemäß 57]:

- Immunstatus vor der Transplantation
- Voraussage von Phasen akuter Abstoßung und chronischer Dysfunktion des Transplantats
- Identifizierung von operativ-toleranten<sup>2</sup> Patienten

Die Identifizierung von stabilen und operativ-toleranten Patienten würde eine langsame Reduktion oder sogar vollständige Entwöhnung von Immunsuppressiva erlauben und damit deren Nebenwirkungen minimieren (siehe auch Abschnitt 1.1.2).

Bei der Transplantation von Zellen oder Geweben, welche nicht vom Empfänger selbst stammen, handelt es sich um eine Allogtransplantation. Wird das Transplantat vom Spender ohne die zusätzliche Verabreichung von Immunsuppressiva akzeptiert, spricht man von allogener Toleranz.

Auf der Suche nach Biomarkern zur Vorhersage von allogener Toleranz wurde das mitochondriale Protein TCAIM (früher auch TOAG-1 genannt: *tolerance-associated gene 1*) erstmals 2007 von Sawitzki *et al.* beschrieben. Hierbei wurden Tcaim mRNA (*messenger ribonucleic acid*) Expressionslevel während einer akuten Abstoßung und Toleranzinduktion bestimmt. Die Toleranzinduktion wurde durch die Verabreichung eines nicht-depletierenden  $\alpha$ CD4 Antikörpers (Ratte: RIB5/2, Maus: YTS177/DST) erzielt. Bei allogener Nierentransplantation im Rattenmodell zeigte sich, dass Tiere, die eine akute Abstoßung

<sup>1</sup> Teile dieses Kapitels wurden bereits publiziert:

Schumann, J., Stanko, K., Woertge, S., Appelt, C., Schumann, M., Kühl, A. A., Panov, I., Schliesser, U., Vogel, S., Ahrlich, S., Vaeth, M., Berberich-Siebelt, F., Waisman, A. and Sawitzki, B. (2014). The Mitochondrial Protein TCAIM Regulates Activation of T Cells and Thereby Promotes Tolerance Induction of Allogeneic Transplants. American Journal of Transplantation. doi: 10.1111/ajt.12941

<sup>2</sup> Bei der Abwesenheit einer Immunantwort gegenüber einem spezifischen Antigen (ohne den Gebrauch von Immunsuppressiva) spricht man von „echter“ immunologischer Toleranz. Die Toleranz gegen ein spezifisches Antigen kann im Tiermodell nachgewiesen werden, in dem geprüft wird, ob ein zweites Transplantat des gleichen Spenders ebenso toleriert wird und das eines dritten (aber unterschiedlichen) Spenders abgestoßen wird [251]. Operative Toleranz dagegen ist als stabile Funktion des Transplantats ohne den Einsatz von Immunsuppressiva definiert. Es treten keine Anzeichen einer Abstoßung auf, jedoch kann nicht geprüft werden, ob diese Toleranz Antigen-spezifisch ist [251, 252].

entwickelten, eine sehr geringe *Tcaim*-Expression in peripheren Leukozyten aus dem Blut aufwiesen. Dagegen hatten Tiere, die Toleranz entwickelten, ein konstant hohes *Tcaim*-Expressionslevel. Diese Beobachtungen trafen ebenfalls für Herztransplantationen bei Mäusen zu. Während es bei einer akuten Abstoßung zu einer Verminderung des *Tcaim*-Expressionslevels in den Transplantat-infiltrierenden Zellen sowie im Blut kam, wiesen infiltrierende CD4<sup>+</sup> T-Zellen unter Toleranzinduktion eine konstant hohe Expression auf [54].

TCAIM ist ein stark konserviertes Protein und zeigt eine große Homologie zwischen verschiedenen Spezies, wie Maus, Ratte und Mensch. Zu bereits bekannten Proteinen oder Proteindomänen gibt es keine Homologien. Es ist in naiven CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie in CD11b<sup>+</sup> und CD11c<sup>+</sup> Zellen stark exprimiert und wird im Zuge einer Aktivierung herunterreguliert [54].

*Tcaim* ist nukleär kodiert (Chromosom 9, ENSMUSG00000046603), besitzt jedoch eine N-terminale mitochondriale Zielsequenz. Mitochondriale Proteine, die nukleär kodiert sind, verfügen über eine Zielsequenz, die sie für ihren Bestimmungsort innerhalb der Mitochondrien kennzeichnet. Mitochondriale Zielsequenzen sind in ihrem Aufbau sehr variabel. Des Weiteren können sie, müssen jedoch nicht, abgespalten werden. Eine computationale Analyse ergab eine hohe Wahrscheinlichkeit für eine N-terminale spaltbare Vorsequenz, die das zweite und Teile des dritten Exons umfasst [58, 59]. Eine spaltbare Vorsequenz würde Proteine in die mitochondriale Matrix dirigieren. Allerdings enthalten einige Proteine auch nachfolgende Signale, die einen anderen endgültigen Bestimmungsort festlegen [60]. Die Variabilität mitochondrialer Zielsequenzen erschwert eine Aussage über deren interne Lokalisation. Bisher konnte gezeigt werden, dass TCAIM tatsächlich mitochondrial lokalisiert ist [61]. Eine genauere interne Lokalisierung ist derzeit noch unklar.

Sowohl für murine als auch humane T-Zellen konnte gezeigt werden, dass deren Stimulation zu einer Herunterregulation von *Tcaim* führt, wohingegen naive CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen ein hohes Level an *Tcaim* mRNA aufwiesen [54, 61]. Zusammengenommen führten diese Daten zu der Hypothese, dass TCAIM einen inhibitorischen Effekt auf die T-Zellaktivierung ausüben könnte. Aufgrund seiner Lokalisierung liegt das Hauptaugenmerk des ersten Teils dieser Arbeit auf dem Einfluss mitochondrialer Proteine auf die T-Zellaktivierung. Deshalb werden im Folgenden die Aufgaben von Mitochondrien (Abschnitt 2.1.2) und deren Bedeutung für T-Zellen dargestellt (Abschnitt 2.1.3). Zuletzt werden unterschiedliche Techniken zur Generierung transgener Mäuse gegenübergestellt und die für diese Arbeit wichtigen Details erläutert (Abschnitt 2.1.4).

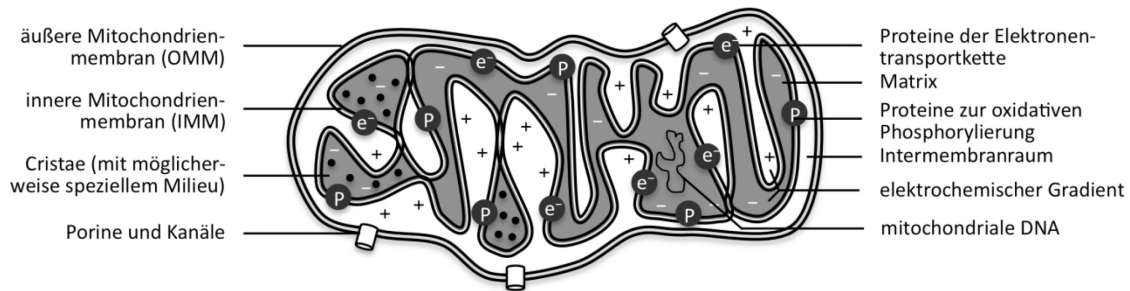
## 2.1.2 MITOCHONDRIEN UND IHRE AUFGABEN

### AUFBAU UND MORPHOLOGIE

Mitochondrien sind von zwei Phospholipid-Doppelmembranen umgeben und gliedern sich in äußere Membran, Intermembranraum, innere Membran, Matrix und Cristae (Abb. 2-1). Die äußere Membran (OMM: *outer mitochondrial membrane*) gleicht im Aufbau und der Zusammensetzung der Zellmembran und ist aufgrund von Porinen und Kanälen durchlässig für Moleküle bis zu einer Größe von 5 kDa. Die innere Membran (IMM: *inner mitochondrial membrane*) hat eine sehr spezielle Zusammensetzung und ist zur Vergrößerung der Oberfläche stark gefaltet. Sie enthält Enzyme der Atmungskette und ist weniger durchlässig für Moleküle als die OMM, was den Aufbau eines elektrochemischen Gradienten



ermöglicht. In der Matrix befinden sich Enzyme des Citrat-Zyklus und die mitochondriale DNA. Neuere Arbeiten beschreiben Cristae als separate Strukturen mit tubulären Verbindungen zur inneren Membran und eigenen Innenraum [62]. Man geht davon aus, dass Mitochondrien aus einst selbständigen Lebewesen nach der Aufnahme durch die Wirtszelle mit der Zeit zu Organellen höherer Lebewesen wurden (Endosymbionten-Theorie) [zusammengefasst in 63].



**Abbildung 2- 1. Aufbau von Mitochondrien**

Die Morphologie von Mitochondrien ist plastisch, wobei in den meisten Zelltypen Mitochondrien als lange miteinander verbundene tubuläre Strukturen vorkommen [64]. Mitochondriale Fusion, also das Verschmelzen von Mitochondrien, und der entgegengesetzte Prozess, die Fission, bestimmen die Morphologie und werden unter dem Überbegriff mitochondriale Dynamik zusammengefasst. Die Fission wird hauptsächlich durch die Proteine DRP1 (*dynamamin-related protein 1*) und FIS1 (*fission 1 protein*) kontrolliert. DRP1 ist ein zytoplasmatisches Protein, das nach der Bindung an die OMM oligomerisieren und eine Abschnürung bewirken kann. Zu Proteinen, die mit einer Fusion in Verbindung gebracht werden, zählen u.a. Mitofusine. Viele der molekularen Prozesse, die zur Fusion und Fission führen sind noch weitestgehend unbekannt [64, 65].

Mitochondrien sind mit dem ER und dem Zytoskelett verbunden. Interaktionen zwischen ER und Mitochondrien können Fissionsstellen markieren und tragen wahrscheinlich auch zur Teilung bei [66, 67]. Untersuchungen des axonalen Transports zeigten, dass der Transport von Mitochondrien sowohl entlang von Mikrotubuli als auch von Aktinfilamenten geschieht [zusammengefasst in 68].

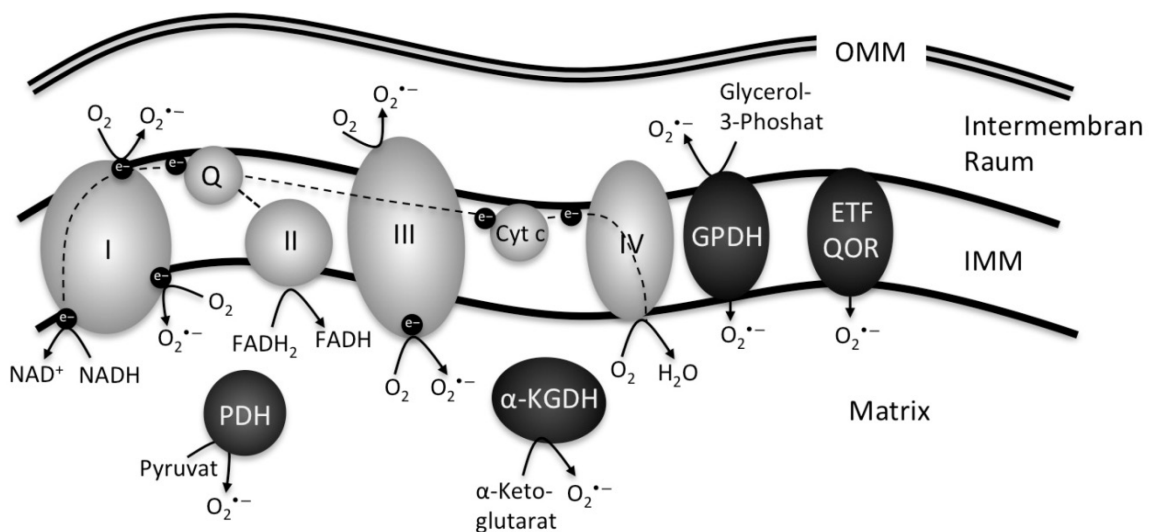
## ENTSTEHUNG UND WIRKUNG VON REAKTIVEN SAUERSTOFFSPEZIES

Der Begriff reaktive Sauerstoffspezies oder -intermediate (auch ROS genannt: *reactive oxygen species*) umfasst Sauerstoffmetabolite, die als natürliche Folge der aeroben Lebensweise in der Atmungskette entstehen, aber auch aktiv auf zellulärer Ebene generiert werden können und dann zur Abtötung von Krankheitserregern beitragen. Zunächst wurden ROS (generiert durch die Atmungskette) ausschließlich eine zellschädigende Wirkung zugeschrieben [47]. Eine wachsende Anzahl neuerer Publikationen zeigt, dass ROS auch eine elementare Rolle in der Signaltransduktion als sekundäre Botenstoffe intakter Zellen zukommt [zur allgemeinen Übersicht 7].

Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) konnte als erstes reaktives Sauerstoffintermediat und Nebenprodukt der Atmungskette beschrieben werden [69–71]. Später wurde nachgewiesen, dass dies nur ein Folgeprodukt der Dismutation des Superoxidanions (auch Hyperoxid

genannt;  $O_2^{\bullet-}$ ) ist [72]. Superoxidanionen entstehen durch die Ein-Elektron-Reduktion von molekularem Sauerstoff [zusammengefasst in 73].

Zu den Bildungsorten von Superoxidanionen zählt in erster Linie die Elektronentransportkette (Abb. 2-2). Mitochondrial produzierte ROS werden im Folgenden als mROS bezeichnet. Der Elektronentransport führt zum Aufbau eines elektrochemischen Gradienten über die IMM, wobei Elektronen von NADH und  $FADH_2$  unter Beteiligung mehrerer Komplexe auf Sauerstoff übertragen werden (Abb. 2-2, schwarze unterbrochene Linie) [63]. Am höchsten ist die Bildung von Superoxidanionen am Flavinmononukleotid-Kofaktor auf der Matrixseite des Komplex I. Möglicherweise kommt es aber auch nahe der Ubichinon-Bindestelle zur Bildung von Superoxidanionen [74]. Komplex III nimmt Elektronen von Ubichinol auf und kann diese unter bestimmten Umständen auf Sauerstoff übertragen. Die entstehenden Superoxidanionen können zu beiden Seiten entlassen werden. Die Superoxidproduktion am Komplex III ist gering und steigt nur durch die Hemmung des Elektronentransports an diesem Komplex stark an. Es ist dennoch möglich, dass die geringe Superoxidfreisetzung physiologisch relevant ist [75]. Weitere Enzyme, die zur Bildung von Superoxidanionen beitragen können, sind Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase (GPDH), Acetyl-Co-A-Dehydrogenase (über die ETF:CoQ-Oxidoreduktase),  $\alpha$ -Ketoglutaratdehydrogenase ( $\alpha$ -KGDH) und Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) (Abb. 2-2). Diese Enzyme sind Bestandteile des Citrat-Zyklus ( $\alpha$ -KGDH), der Glykolyse (PDH, z.T. GPDH) und des Fettsäureabbaus (ETF-Q-Oxidoreduktase). Ihr Beitrag zur Bildung von Superoxidanionen ist jedoch verglichen mit der Elektronentransportkette eher gering [75, 76].

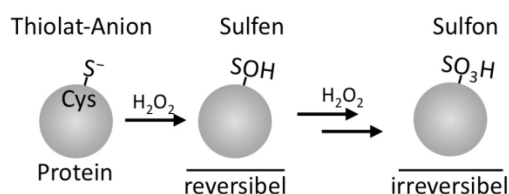


**Abbildung 2- 2. Bildungsorte von mROS** [Abbildung adaptiert und modifiziert nach 77, 78]. Dargestellt ist die Elektronentransportkette mit den Komplexen I, II, III und IV, sowie die Elektronenüberträger Ubichinon (Q) und Cytochrom c (Cyt c). Elektronen ( $e^-$ ) durchwandern diese Proteine in angegebener Richtung (schwarze unterbrochene Linie). Innerhalb der Atmungskette entstehen Superoxidanionen ( $O_2^{\bullet-}$ ) an den Komplexen I und III. Weitere mitochondriale Enzyme, die zur Bildung von mROS beitragen sind Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase (GPDH), ETF-Q-Oxidoreduktase (ETFQOR), Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) und  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase ( $\alpha$ -KGDH) bei dem Umsatz ihrer jeweiligen Substrate.

Superoxidanionen sind sehr instabil und können nicht-enzymatisch in wässriger Lösung oder enzymatisch durch Superoxiddismutasen zu  $H_2O_2$  reagieren [7].  $H_2O_2$  ist wesentlich

stabiler und darüber hinaus membranpermeabel, weshalb es auch außerhalb von Mitochondrien wirksam ist [79]. Zu den ROS zählen noch eine Vielzahl weiterer Intermediate, welche allerdings in dieser Arbeit nicht behandelt werden.

In niedrigen Konzentrationen wirkt  $\text{H}_2\text{O}_2$  als mildes Oxidationsmittel und kann durch die Oxidation von Cysteinresten die Proteinaktivität beeinflussen (Abb. 2-3). Die Nähe von positivgeladenen Aminosäuren begünstigt die Deprotonierung von Cysteinen (Thiolat-Anion), welche infolgedessen durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxidiert werden können. Ausgehend hiervon können sich intra- oder intermolekulare Disulfidbrücken bilden, welche die Proteinstruktur stark verändern. Dieser Zustand ist jedoch reversibel und durch Antioxidantien wieder in den Ausgangszustand überführbar. Die weitere Einwirkung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  führt zur Sulfonisierung von Proteinen, ein irreversibler Zustand, der die zellschädige Wirkung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  offenbart [48, 78].



**Abbildung 2- 3. Darstellung der Redoxsensitivität von Proteinen** [Abbildung adaptiert und modifiziert nach 78] Deprotonierte Cysteinreste können durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  reversibel zu Sulfen-Formen oxidiert werden. Eine stärkere Oxidation über Intermediate zu einem Sulfonrest ist irreversibel.

Um die Zelle vor einer unkontrollierten ROS-Akkumulation zu schützen, besitzt sie Antioxidantien. Das sind Substanzen, die in relativ geringen Mengen fähig sind, mit oxidierbaren Agenzien zu konkurrieren und damit deren Oxidation zu verzögern oder zu inhibieren [80]. Zu den zellulär bedeutsamen Antioxidantien zählen Superoxiddismutase, Katalase, Gluthation, Peroxidase sowie Vitamin E und A [80].

Unterschiedliche zelluläre Zustände können die Bildung von mROS fördern [gemäß 75]. Eine durch Ischämie, Apoptose oder andere Ursachen gestörte Atmungskette führt zur hohen mROS-Produktion an Komplex I. Die höchste Menge an Superoxidanionen wird bei reverssem Elektronentransport (RET; also ein Elektronenfluss von Ubichinon zu Komplex I) an Komplex I freigesetzt. Ein hohes Membranpotential bei einer gleichzeitig geringen Atmung sind Voraussetzungen für einen RET und gleichzeitig Bedingungen, die für aktivierte T-Zellen zutreffen [81, 82]. Aber auch unter „normalen“ Bedingungen kann die Beteiligung von allen potentiellen Bildungsstellen zu einer physiologisch relevanten Menge mROS führen.

### 2.1.3 DIE ROLLE VON MITOCHONDRIEN WÄHREND DER T-ZELLAKTIVIERUNG

Im folgenden Abschnitt wird die Bedeutung von Mitochondrien für die T-Zellaktivierung an einigen Beispielen dargestellt. Dabei stehen die Morphologie und Lokalisation der Mitochondrien, sowie die Bildung von mROS und ihre Rolle an der IS, bei der Signaltransduktion und des Energiestoffwechsels im Vordergrund.

#### MORPHOLOGIE UND LOKALISATION

Nach einer T-Zellstimulation akkumulieren Mitochondrien an der IS [83]. Eine Umverteilung und Polarisierung nach Stimulation konnte auch bei NK-Zellen gezeigt werden [84]. Die Rekrutierung von Mitochondrien zur IS ist kalziumabhängig und essentiell für die T-Zellaktivierung [83, 85, 86]. Eine Voraussetzung dafür ist eine gesteigerte Fähigkeit zur Fission, wahrscheinlich da Mitochondrien von geringerer Größe leichter transportiert

werden können [49]. Der Fissionsfaktor DRP1 ist zur Verteilung der Mitochondrien nahe des äußeren Bereiches der IS (pSMAC: *peripheral supramolecular activation cluster*) notwendig [83]. Contento *et al.* beschreiben, dass die Rekrutierung von Mitochondrien zur IS nicht durch die TZR-Stimulation sondern durch Zytokin-vermittelte Aktivierung von LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigene 1*) erfolgt [87]. Die Positionierung trägt zur lokalen Versorgung von Adenosintriphosphat (ATP) und durch mehrere Mechanismen (s.u.) zur Erhaltung und Verlängerung der Aktivierung bei [85, 86, 88].

Ein Zusammenhang zwischen mitochondrialer Morphologie und ROS-Produktion konnte mehrfach gezeigt werden. Hyperglykämische Bedingungen induzieren in Ratten-Myoblasten eine DRP1-vermittelte gesteigerte Fission von Mitochondrien, was eine erhöhte ROS-Produktion nach sich zieht [89]. Andere Publikationen zeigen eine umgekehrte Abhängigkeit zwischen der Bildung von mROS und mitochondrialer Fission. So führt die Defizienz von Komplex I zu einer erhöhten ROS-Produktion und infolgedessen zu einer gesteigerten Fission [90]. Eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Fragmentierung von Mitochondrien konnte an vielen Zelltypen nachgewiesen werden [91, 92].

#### **EINFLUSS VON MITOCHONDRIEN UND MROS AUF DIE SIGNALTRANSDUKTION IN T-ZELLEN**

Eine der wichtigsten Signalkaskaden während der T-Zellaktivierung führt via IP<sub>3</sub> zur Depletion der intrazellulären Kalziumvorräte (siehe Abschnitt 1.1.2). Folglich werden sogenannte CRAC-Kanäle in der Zellmembran aktiviert, um einen dauerhaften Kalziumeinstrom zu ermöglichen [93]. Eine hohe lokale Kalziumkonzentration kann jedoch zur kalziumvermittelten Inaktivierung der Kanäle führen [94, 95]. Die Nähe von Mitochondrien zur IS und deren Fähigkeit Kalzium aufzunehmen, trägt dazu bei dessen Konzentration lokal gering zu halten und damit einen anhaltenden Einstrom zu ermöglichen [86]. Somit wird die nukleäre Lokalisierung von NFAT und damit die Zellaktivierung verlängert [96].

Die erhöhte Kalziumkonzentration in den Mitochondrien stimuliert die Enzyme des Citratzyklus [97, 98]. Das Ankurbeln dieses Stoffwechselwegs führt wiederum zu einem Anstieg von NADH und FADH<sub>2</sub>, welche ihrerseits die Aktivität der Atmungskette stimulieren. Das Resultat ist ein Anstieg von mROS [99]. Ein kooperativer positiver Rückkopplungsmechanismus von ROS und Kalzium konnte für die B-Zellrezeptor-vermittelte Aktivierung gezeigt werden [100].

Wie bereits beschrieben sind Mitochondrien als großes Netzwerk organisiert, das am ER angeheftet ist. Dieser Kontakt ist für T-Zellen auf verschiedenste Weise bedeutsam. Die Verbindung zwischen Mitochondrien und ER führt zu einer Immobilität des mitochondrialen Netzwerkes. Dies lässt die gesteigerte Fission im Fall einer T-Zellaktivierung schlüssig erscheinen [49, 50, 83]. Darüber hinaus kann Mitofusin, ein Protein das an der mitochondrialen Fusion beteiligt ist, den Transport von STIM1 vom ER zur Plasmamembran hemmen. Dies ist wichtig um unkontrollierten Kalziumeinstrom zu vermeiden, wenn Mitochondrien nicht mehr als Kalziumpuffer dienen können [101].

MROS spielen für T-Zellen in mehreren Prozessen, wie Aktivierung, Proliferation und IL-2 Sekretion eine wichtige Rolle [102, 103]. Wie in Abschnitt 1.1 beschrieben, führt die Aktivierung von NFAT, NF-κB und AP-1 zur Bildung von IL-2. Eine Redoxsensitivität konnte für Proteine der Signalkaskaden, die zur Aktivierung der genannten Transkriptionsfaktoren führen, nachgewiesen werden, aber auch für NF-κB und AP-1 selbst [104–106]. Frühe

Untersuchungen zeigten, dass exogen zugefügtes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zur Bindung von NF- $\kappa$ B an DNA führt [107]. In den folgenden Jahren konnte für eine Vielzahl an Proteinen, die an Signalwegen zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B und AP-1 beteiligt sind, eine Redoxsensitivität nachgewiesen werden [zusammengefasst in 7]. Auch führte die Defizienz eines Proteins aus Komplex III zu einer verminderten NFAT-Aktivierung und IL-2 Sekretion. In dieser Studie beeinflussten mROS hauptsächlich die Kalzium-vermittelte Signaltransduktion [105].

Des Weiteren wurde beschrieben, dass Mitochondrien einen Einfluss auf die T-Zelldifferenzierung und die Ausbildung von Gedächtnis-T-Zellen haben. Beispielsweise besitzen CD8<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen eine größere mitochondriale Reservekapazität als CD8<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen. Dies förderte das Überleben und ermöglichte eine schnelle zweite Antwort [108]. Eine weitere Studie zeigte, wie essentiell einzelne metabolische Wege für die Entwicklung von Gedächtnis-T-Zellen sind. So wurde die Bildung von CD8<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen aufgrund einer TRAF6-Defizienz (*TNF receptor associated factor 6*), inhibiert. Die Defizienz dieses Faktors führte zur verminderten Nutzung der mitochondrialen Fettsäureoxidation [109], einer der wichtigsten Stoffwechselwege zur Energiegewinnung für CD8<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen [45].

#### ENERGIESTOFFWECHSEL VON T-ZELLEN

Im klassischen Modell für den Metabolismus und die Energiegewinnung von T-Zellen nutzen ruhende T-Zellen fast ausschließlich die oxidative Phosphorylierung während aktivierte T-Zellen im verstärkten Maß (trotz Vorhandensein von Sauerstoff) die Glykolyse zur Energiegewinnung verwenden [110]. Diesen Prozess bezeichnet man als Warburg-Effekt oder aerobe Glykolyse. Vergleicht man die Energieausbeute der beiden Prozesse aus 1 mol Glucose (oxidative Phosphorylierung: 36 mol ATP/mol Glucose; Glykolyse: 4 mol ATP/mol Glucose), ist es schwer zu verstehen, warum T-Zellen im Zuge von Aktivierung, Proliferation und Wachstum auf diesen (eher ineffizienten) Weg zurückgreifen [45]. Eine Erklärung hierfür könnte die schnelle Verfügung und Verwertung von Glukose und die Bildung von essenziellen Zwischenprodukten durch die Glykolyse sein. Auch könnte die dauerhafte oxidative Phosphorylierung, bei einem permanenten Anstieg von mROS, negative Auswirkungen auf die Zelle haben [45].

Die erhöhte Glykolyserate von aktivierten T-Zellen konnte mit einem Anstieg von mROS durch reversen Elektronentransfer (RET) verbunden werden [82, vgl. 2.1.2]. Eine Verknüpfung dieser Prozesse ist ein wichtiger Aspekt für die Abhängigkeit der T-Zellaktivierung von mROS. Denn es ist der RET, der zur Bildung der höchsten Menge mROS führt [75]. Die Autoren beschreiben, dass die T-Zellaktivierung zu einer verstärkten Aktivierung der GPDH (einem alternativen Enzym der Glykolyse) führt, welches Elektronen in den Ubichinonpool übertragen kann [82]. Die geringe Rate der oxidativen Phosphorylierung während der T-Zellaktivierung und eine Sättigung der Elektronentransportkette mit Elektronen (in diesem Fall begünstigt durch GPDH), führt zu RET [75, 111, vgl. 2.1.2].

#### 2.1.4 GENETISCHE SYSTEME UND DIE GENERIERUNG VON TRANSGENEN MÄUSEN

Genetische Manipulation erlaubt die Untersuchung der Funktion einzelner Proteine und deren Auswirkung auf Zellen oder Organismen. Sowohl eine Aktivierung (*gain of function*) als auch das Abschalten (*loss of function*) eines Gens kann durch unterschiedliche Ansätze

erreicht werden. Ersteres kann durch die Einführung des Zielgens und seiner Überexpression oder einer aktivierenden Mutation erreicht werden (*knock-in*, KI). Letzteres kann mit der Induktion von RNA-Interferenz beispielsweise durch die Überexpression von siRNAs (*small interfering RNA*) erzielt werden (*knock-down*). Ein alternativer Weg ist die Einführung einer Mutation im Zielgen, die zum Funktionsverlust führt (*knock-out*, KO). Darüber hinaus kann die Einführung von Reportergenen zur Aufklärung des Expressionsmusters des Zielgens dienen [112].

Transgene Tiere erlauben die Untersuchung eines Gens und dessen Regulation innerhalb eines Organismus. Zudem wird die genetische Modifikation stabil an die Nachkommen vererbt. Modifikationen, die gewebsspezifisch auftreten, bieten gegenüber Zellkulturen den Vorteil, dass die Auswirkungen *in vivo* verfolgt werden können [112]. Es können grundsätzlich drei verschiedene Methoden zur Einführung genetischer Modifikationen unterschieden werden: Pronukleusinjektion, homologe Rekombination und die Nutzung virusabhängiger Systeme.

Bei der Pronukleusinjektion wird genetisch manipulierte DNA in den Pronukleus einer Zygote injiziert [113]. Bei einer Integration der DNA in das Genom wird diese stabil an die Nachkommen vererbt. Die Integrationsorte der injizierten DNA sind nicht vorhersagbar und die Nachkommen aus unterschiedlichen Mikroinjektionen deshalb genetisch nicht identisch [112].

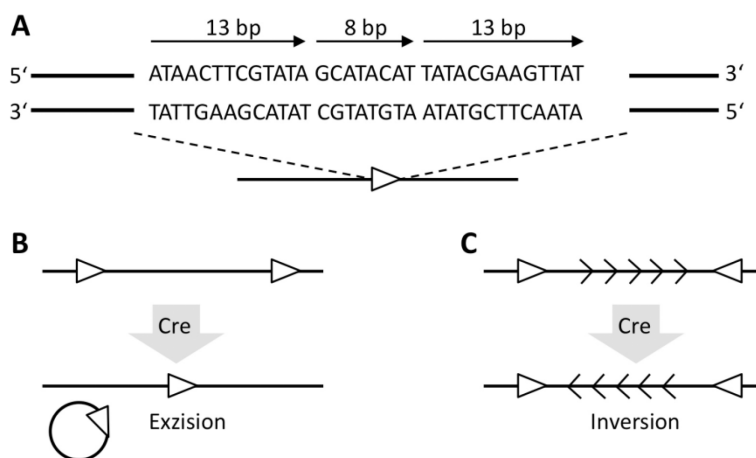
Die homologe Rekombination ist eine wesentlich aufwendigere Art zum Einbringen genetischer Modifikationen. Im Gegensatz zur Pronukleusinjektion ist diese Technik vor allem zur Generierung von genetisch veränderten Mäusen etabliert. Hier werden zunächst genetisch modifizierte embryonale Stammzellen erzeugt, die anschließend in eine wildtypische Blastozyste injiziert werden. Es entsteht ein chimärer Organismus. Sind in diesem Organismus genetisch veränderte Keimzellen vorhanden (Keimbahnchimäre), kann die Mutation in der Folgegeneration an die Nachkommen vererbt werden. Die Manipulation embryonaler Stammzellen erfordert ein Plasmid als Zielvektor mit ausgedehnten homologen Bereichen zum Rekombinationsort. Nach der Transfektion der embryonalen Stammzellen mit dem Plasmid kommt es in einer von  $10^6$ - $10^9$  Zellen zur homologen Rekombination. Durch die Verwendung von Selektionsmarkern erlangt man eine Anreicherung dieser Zellen. Die zielgerichtete Mutation erlaubt die direkte Manipulation des Zielgens und damit die Bildung von KO-Tieren. Aber auch ein zielgerichtetes Einbringen von Genen (KI) sowie konstant aktivierte Proteine (z.B. durch Modifikation von Phosphorylierungsstellen) lassen sich so erzeugen [112].

Ein weiteres Verfahren zur Einführung von genetischem Material nutzt die Fähigkeit von Retroviren zur Integration in das Genom [114, 115]. Ein Vorteil dieser Methode ist die Effektivität und die Anwendbarkeit in unterschiedlichen Spezies [112, 116].

Zusätzlich zu den klassischen Verfahren gibt es auch neuere Methoden, die zum Teil eine ortsspezifische Rekombination ohne vorhergehende Stammzellmanipulation zulassen. Nebst anderen ist das Verfahren basierend auf Zinkfinger-nukleasen vielversprechend [116, 117].

Genetische Veränderungen, die den gesamten Organismus betreffen, insbesondere das Abschalten eines Gens, sind oft mit gravierenden Komplikationen verbunden. Im schlimmsten Fall führt es zur Letalität. Ein Schritt in der Überwindung dieser Hindernisse ist die Anwendung des Cre/*loxP*-Systems [118, 119].

Cre (*causes recombination*) ist eine ortsspezifische Rekombinase aus der Superfamilie der  $\lambda$ -Integrasen des Bakteriophagen P1 und erkennt eine Sequenz von 34 bp, die als *loxP*-Stellen (*locus of cross over (x) in P1*) bezeichnet werden<sup>3</sup> (Abb. 2-4 A). Sie schneidet DNA an zwei identischen *loxP*-Stellen und ligiert sie zu einem kontinuierlichen Produkt [120]. Flankieren zwei *loxP*-Stellen gleicher Orientierung einen Bereich kommt es durch die Cre-vermittelte Rekombination zu einem Verlust dieses Sequenzbereiches (Abb. 2-4 B: Exzision). Sind die *loxP*-Stellen entgegengesetzt orientiert kommt es zur Inversion des Sequenzbereiches (Abb. 2-4 C) [112]. Die Cre-Expression unter gewebs- oder zellspezifischen Promotoren kann so zur Aktivierung der eingeführten Mutation im entsprechenden Gewebe oder Zelltyp führen.



**Abbildung 2- 4. *LoxP*-Sequenz und Cre-vermittelte Rekombination**

[Abbildung adaptiert und modifiziert nach 112]. **A** Die *loxP*-Sequenz besteht aus zwei 13 bp langen palindromischen Sequenzen. Sie werden durch eine 8 bp lange asymmetrische Sequenz getrennt. **B** Die Rekombination von *loxP*-Sequenzen gleicher Orientierung, führt zum Verlust des dazwischen liegenden Bereichs (Exzision). **C** Die Rekombination von zwei *loxP*-Stellen entgegengesetzter Orientierung führt zur Inversion des Bereichs.

### **ROSA26 LOKUS ALS ORT FÜR EINEN PROTEIN KNOCK-IN**

Die homologe Rekombination als Methode zur Generierung einer zielgerichteten Insertion des Transgens ist im Vergleich zur klassischen Pronukleusinjektion oder zur Nutzung von viralen Vektoren sehr aufwendig. Der Vorteil dieser Methode liegt in der Ortsspezifität. Eine ungerichtete Insertion, wie sie typisch für die Pronukleus- oder Virusinjektion ist, kann essenzielle Gene oder regulatorische Abschnitte unterbrechen, was sich sowohl im Phänotyp als auch in der Expressionsrate des Transgens niederschlagen kann. Darüber hinaus integrieren bei der Pronukleusinjektion durch Konkatemerbildung erfahrungsgemäß mehr als eine Kopie des Transgens. [121]. Da jedes Gründertier ausgehend von einer Injektion (DNA oder Viruspartikel) genetisch unterschiedlich ist, kann das parallele Züchten und Testen mehrerer Linien nebeneinander ebenso zeitintensiv sein wie das Verfahren bei der homologen Rekombination.

Der *ROSA26* Locus (*R26*) wurde bei Promotor-*Genetrap*<sup>4</sup> Experimenten erstmals beschrieben [122]. Der auf Chromosom 6 liegende Genabschnitt [123] wurde konstant in

<sup>3</sup> Ein analoges System aus der Hefe ist das Flippase-Recombinase (FLP)/*FL-target* (FRT) -System [112].

<sup>4</sup> Promotor-*Genetrap*-Vektoren enthalten ein Reporter-Gen und müssen in ein Exon integrieren um durch einen endogenen Promotor aktiviert zu werden [112]. Die bei der Entdeckung des *R26* Locus genutzten Vektoren enthielten einen Leserahmen für das  $\beta$ -Galaktosidase Gen [122].

den meisten Geweben und hämatopoetischen Zellen exprimiert [124]. Er enthält drei offene Leserahmen, von denen eines für ein Protein unbekannter Funktion kodiert. Durch den *Genetrap* wurden die beiden nichtkodierenden Transkripte zerstört, was jedoch nicht in einen offensichtlichen Phänotyp resultierte [124]. Die ubiquitäre Expression und das Fehlen eines offensichtlichen Phänotyps sind gewünschte Eigenschaften einer Region für einen zielgerichteten *knock-in* [125, 126].

### 2.1.5 SPEZIFISCHE FRAGESTELLUNG

Ziel des ersten Teils dieser Arbeit war es, die Auswirkung von TCAIM auf die Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen zu untersuchen. Im Zuge einer Transplantatabstoßung wird das *Tcaim*-Expressionslevel sowohl im Blut als auch in den das Transplantat infiltrierenden Zellen herunterreguliert. In Gegensatz hierzu geht die Toleranzinduktion mit einem konstant hohen *Tcaim*-Expressionslevel einher [54]. Wie unter 1.5 dargestellt spielen T-Zellen und deren Aktivierung durch Alloantigene eine zentrale Rolle in Abstoßungsprozessen. Vorangestellte Befunde sowie die negative Korrelation des *Tcaim*-Expressionslevels mit der T-Zellaktivierung [54, 61] deuteten auf einen Einfluss von TCAIM auf diese Prozessen hin. Um die konstante Expression während der T-Zellaktivierung zu erhalten, wurde eine *Tcaim*-überexprimierende Mauslinie generiert, wobei die genetische Modifikation eine konditionelle Expression in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen ermöglichte. Entsprechend stand zunächst eine molekular- und zellbiologische Methodik im Vordergrund. Anschließend folgten phänotypische Untersuchungen von immunologisch wichtigen Zellpopulationen und Organen. Die Charakterisierung von T-Zellsubpopulationen ergab erste wegweisende Schritte für die funktionelle Analyse. Mit einer konditionell *Tcaim*-überexprimierenden Mauslinie und der damit verbundenen Möglichkeit die molekulare Funktion von TCAIM in (naiven) primären T-Zellen zu untersuchen, sollte ein weiterer Aspekt dieser Arbeit ausgefüllt werden. Hierbei wurde TCAIM als mitochondriales Protein vor allem zell- und molekularbiologisch untersucht. Es sollte geklärt werden, auf welche mitochondrial-gesteuerten Prozesse TCAIM eine Auswirkung hat.

Anschließend wurden die funktionellen Auswirkungen einer *Tcaim*-Überexpression auf die Eigenschaften von T-Zellen detaillierter untersucht. In diesem Zusammenhang konzentrierte sich die Arbeit auf die Population CD4<sup>+</sup> T-Zellen innerhalb der T-Lymphozyten, um folgende Fragen zu beantworten: Wie wirkt sich eine konstant hohe *Tcaim*-Expression auf die Aktivierung und die Effektorfunktionen von T<sub>H</sub>-Zellen aus? Ist dies durch die Veränderung mitochondrialer Prozesse erklärbar?

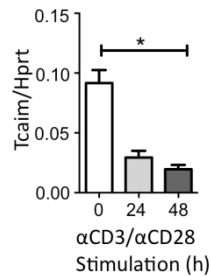
Abschließend sollte die Frage beantwortet werden, ob sich die Ergebnisse, die in den *in vitro* Experimenten gewonnen wurden, auf ein *in vivo*-Modell übertragen lassen. Nachdem gezeigt wurde, dass eine Toleranzinduktion mit einem hohen *Tcaim*-Expressionslevel in T-Zellen einhergeht [54], war es umgekehrt interessant, ob eine konstante *Tcaim*-Expression in T-Zellen die Abstoßung verzögern oder verhindern kann. Darüber hinaus wurde untersucht, ob sich auch *in vivo* der Einfluss von TCAIM auf die T-Zellaktivierung äußert und damit möglicherweise das Ergebnis der Transplantationsstudien erklärt.



## 2.2 ERGEBNISSE

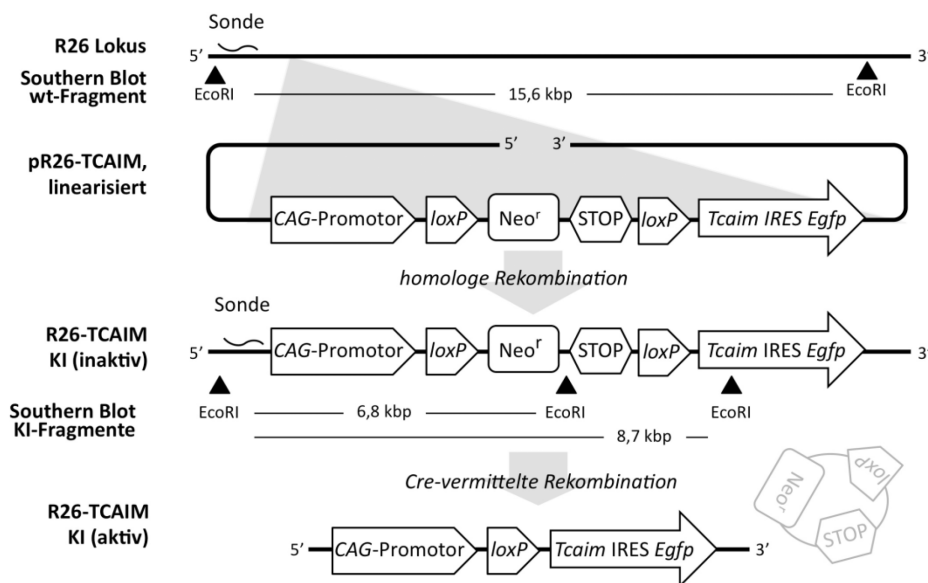
### 2.2.1 GENERIERUNG EINER *TCAIM*-ÜBEREXPRIMIERENDEN MAUSLINIE (*TCAIM* KNOCK-IN)

Die T-Zellaktivierung geht mit einer verminderten *Tcaim*-Expression einher. Dies zeigten sowohl eigene (Abb. 2-5) als auch bereits publizierte Daten [54, 61]. Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine Transplantatabstoßung mit einer verminderten *Tcaim*-Expression positiv korreliert [54]. Diese Untersuchungen führten zur Hypothese, dass eine hohe *Tcaim*-Expression mit der T-Zellaktivierung interferiert.



**Abbildung 2- 5. *Tcaim*-Expression in CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach polyklonaler Stimulation.** *Tcaim* und Hypoxantin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (Hprt) mRNA Level wurden von unstimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen und 24 bzw. 48 h nach  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28-vermittelter Stimulation bestimmt. Das Verhältnis von *Tcaim* zu Hprt als *housekeeping*-Gen ist dargestellt (n = 5, Balken repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM (standard error of the mean), Friedman Test und *post-hoc* Dunns-Vergleich: \* $p \leq 0,05$ ).

Die Generierung einer konditionellen *Tcaim* knock-in (KI) Mauslinie wurde als methodischer Ansatz gewählt um dieser Fragestellung nachzugehen. Hierzu sollte der *Tcaim*-Leserahmen in den *R26* Locus integriert werden. Die genetische Veränderung ist schematisch in Abbildung 2-6 gezeigt.



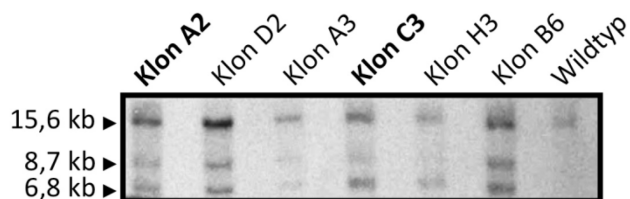
**Abbildung 2- 6. Schema zur homologen Rekombination des Zielvektors mit dem wildtypischen *R26* Locus.** Dargestellt ist der *R26* Locus im wildtypischen Zustand (*R26*), nach homologer Rekombination mit dem Zielvektor pR26-*Tcaim* (*R26-Tcaim* KI; inaktiv) und nach Cre-vermittelter Rekombination (*R26-Tcaim* KI; aktiv). Die *Cre*-Expression führt zum Verlust der Neomycin/Geneticin-Resistenz (*Neo<sup>r</sup>*) und der STOP-Kassette (STOP). Das entstehende DNA-Fragment wird abgebaut. *Tcaim* und *Egfp* werden durch eine interne ribosomale Eintrittsstelle (*IRES*) koexprimiert. Southern Blot: eine radioaktiv-markierte Sonde bindet im 5'-Bereich des Locus. Im wildtypischen Zustand kann dadurch nach dem EcoRI-Verdau ein 15,6 kbp großes Fragment detektiert werden (wt), nach homologer Rekombination ein 6.8 kbp Fragment (KI). Bei Unzugänglichkeit der ersten EcoRI-Stelle im mutierten Allel kommt es zur Bildung eines 8,7 kbp großen Fragments (KI).

Eine STOP-Kassette, die von *loxP*-Stellen flankiert ist, befindet sich 5' des *Tcaim*-Leserahmens und verhindert dadurch die vorzeitige *Tcaim*-Expression (Abb. 2-6: *R26-Tcaim* KI, inaktiv). Erst die Cre-vermittelte Rekombination und die damit verbundene Exzision dieses Bereiches, erlaubt eine konstante *Tcaim*-Expression (Abb. 2-6: *R26-Tcaim* KI, aktiv). Eine zell- oder gewebsspezifische *Tcaim*-Expression erfolgt, wenn *Tcaim* KI Tiere mit solchen verpaart werden, die *Cre* zell- oder gewebsspezifisch exprimieren.

#### SOUTHERN BLOT VON POSITIV SELEKTIONIERTEN ZELLKLONEN

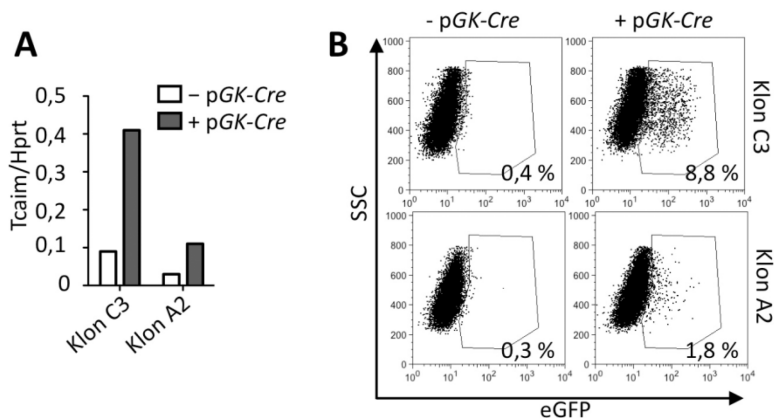
Der Zielvektor p*R26-Tcaim* (Vektorkarte und detaillierte Beschreibung siehe 5.1.5) wurde in embryonale Stammzellen (ES-Zellen) der Linie V6.5 elektroporiert. Eine Positiv-Selektion führte zur Vermehrung der Zellklone, die den Selektionsmarker trugen. Um zu überprüfen, ob es zur homologen Rekombination am *R26* Locus kam, wurden ausgewählte Zellklone durch einen Southern Blot getestet (Erklärung zum Prinzip des Southern Blots und detaillierte Beschreibung zur Herstellung *Tcaim*-transgener ES-Zellen siehe 5.1-5.3).

Durch die spezifische Bindung einer Sonde konnte im wildtypischen *R26* Locus ein Fragment mit der Größe von 15,6 kbp detektiert werden, nach homologer Rekombination dagegen eines mit der Größe von 6,8 kbp. Im letzteren Fall wurde durch die Insertion eine neue Schnittstelle geschaffen, die das Fragment verkürzte (schematisch dargestellt in Abb. 2.6). Abbildung 2-7 zeigt den Nachweis beider Fragmente für die ES-Zellklone A2, D2, A3, C3, H3 und B6. Alle Klone wiesen ein wildtypisches Allel (15,6 kbp) und ein mutiertes Allel (6,8 kbp) auf, da im Regelfall nur ein Allel mit dem Vektor rekombiniert. Kontroll-DNA zeigte nur das wildtypische Fragment. Mit der Ausnahme von H3 war bei allen Klonen noch eine weitere Bande detektierbar (8,7 kbp).



**Abbildung 2- 7. Southern Blot der expandierten ES-Zellklone.** EcoRI-verdaute ES-Zell-DNA wurde mit einer radioaktiv-markierten Sonde hybridisiert. Wildtypische DNA konnte bei Fragmentgröße von 15,8 kbp detektiert werden. ES-Zellklone zeigten Fragmente zusätzlich bei 6,8 kbp oder 8,7 kbp.

Eine homologe Rekombination nimmt ihren Ausgangspunkt an einem Doppelstrangbruch, wobei eine anschließende Paarung homologer Stränge die DNA-Synthese in 5'-Richtung vorgibt [127]. Hierbei kann es zu jedem Zeitpunkt zum Auflösen der Strukturen kommen. Das könnte dazu führen, dass nur ein Teil der Vektorsequenz übertragen wird. Um festzustellen, ob die gesamte funktionelle Vektor-Sequenz integriert wurde, muss daher das Vorhandensein des 5'-Endes als auch des 3'-Endes kontrolliert werden. Durch den Southern Blot wurde die korrekte Rekombination am 5'-Ende der integrierten Sequenz getestet. Das 3'-Ende wurde durch einen funktionellen Test überprüft. Hierzu wurde ein Cre-Expressionsvektor (pGK-Cre) in die positiv getesteten ES-Zellen elektroporiert (Durchführung siehe 5.2.11). *Tcaim*- und *Egfp*-Leserahmen sind die letzten essenziellen Elemente am 3'-Ende des Vektors. Eine erfolgreiche Rekombination des 3'-Endes würde nach pGK-Cre-Elektroporation zu einer erhöhten *Tcaim*- und *Egfp*-Expression führen.



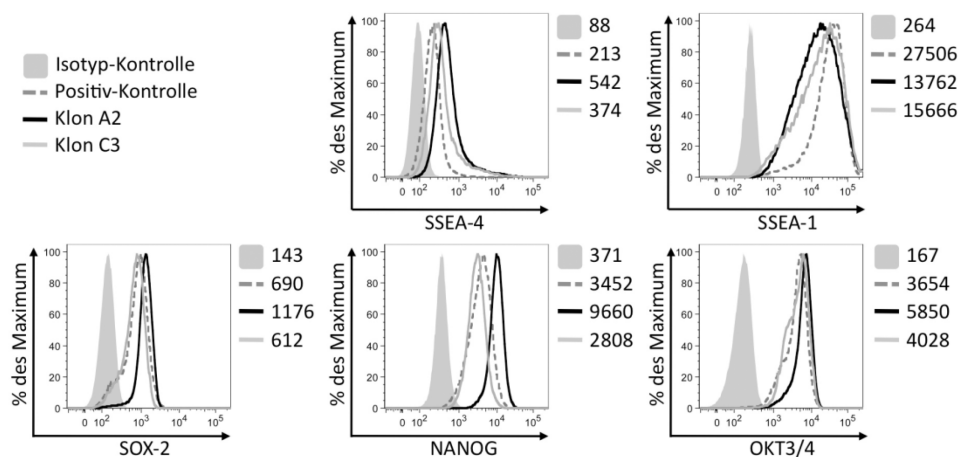
**Abbildung 2- 8. Überprüfung des 3'-Endes des mutierten R26 Lokus.** **A** Dargestellt ist das Tcaim mRNA Level relativ zu Hprt für die ES-Zellklone C3 und A2 2 Tage nach Elektroporation mit oder ohne pGK-Cre. **B** Messung von eGFP<sup>+</sup> ES-Zellen in den ES-Zellklonen C3 und A2 2 Tage nach Elektroporation mit oder ohne pGK-Cre.

Abbildung 2-8 A zeigt am Beispiel der Klone A2 und C3 den Anstieg der Tcaim mRNA 48 h nach Elektroporation von pGK-Cre im Vergleich zu Zellen, die kein pGK-Cre enthielten (A2: 3,6-fach; C3: 4,5-fach). Ebenso konnte eine Zunahme von eGFP<sup>+</sup> ES-Zellen detektiert werden. Bei dem Klon C3 stieg die Anzahl der eGFP<sup>+</sup> ES-Zellen von 0,4 % auf 8,8 % an, bei dem Klon A2 von 0,3 % auf 1,8 % (Abb. 2-8 B).

#### INJEKTION DER POSITIV GETESTETEN KLONE UND CHROMOSOMENANALYSE

Die positiv getesteten Klone wurden expandiert und in C57BL/6 Blastozysten injiziert (Erläuterung des Prinzips unter 5.2.13). Die Injektion erfolgte unter der Leitung von Elena Wiese und Dr. Kurt Reifenberg in der zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Johannes Gutenberg Universität Mainz.

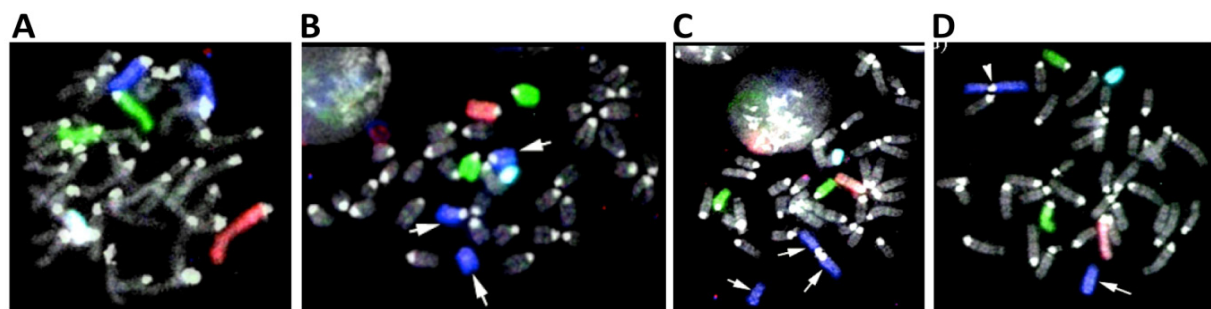
Nachdem mehrere Injektionsversuche fehlschlagen, wurde die Pluripotenz der ES-Zellen untersucht. Verlieren Stammzellen ihre Pluripotenz, können sie nicht mehr zur Bildung des Organismus beitragen. Im pluripotenten Zustand sind die folgenden Marker stark exprimiert: NANOG, SOX-2 (*sex determining region Y-box 2*), OKT3/4 (*octamer-binding transcription factor 4*), SSEA-1 (*stage-specific embryonic antigen 1*) [128–131].



**Abbildung 2- 9. Expression von Pluripotenzenmarkern verschiedener ES-Zellklone.** Dargestellt ist die Expression der Pluripotenzenmarker SSEA-4, SSEA-1, SOX-2, NANOG und OKT3/4 in den ES-Zellklonen A2 (schwarze Linie), C3 (graue Linie), der Isotyp-Kontrolle (ausgefüllt grau) und einer Positivkontrolle (graue unterbrochene Linie) als Histogramm. Neben jedem Histogramm sind die Werte der Fluoreszenzintensität für die unterschiedlichen Zelltypen als geometrisches Mittel (gMFI) angegeben.

Die Expression dieser Marker wurde zur Untersuchung der ES-Zellen herangezogen wobei als Positivkontrolle eine ES-Zelllinie diente, mit der bereits eine Keimbahntransmission gelang (Abb. 2-9, graue unterbrochene Linie). Für alle untersuchten Marker mit Ausnahme von SSEA-1 zeigte Klon C3 eine vergleichbar hohe Fluoreszenzintensität wie die Positivkontrolle (SSEA-1 Fluoreszenzintensität als geometrisches Mittel (gMFI): Positivkontrolle: 27506; C3: 15666). Zellen des Klons A2 zeigten sogar die stärkste Expression der Marker SSEA-4, SOX-2, NANOG und OKT3/4. Dies ließ darauf schließen, dass in den verwendeten Klonen keine Differenzierung stattgefunden hatte, die eine Rekonstitution aus diesen Zellen verhinderte.

Um die genetische Integrität der ES-Zellen zu prüfen, wurden diese für eine Chromosomenanalyse vorbereitet, die von der Firma Chrombios (Nussdorf, Deutschland) durchgeführt wurde (Protokoll zur Vorbereitung siehe 4.2.10). Die häufigsten Aneuploidien in murinen ES-Zelllinien, die eine Transmission des Transgens verhindern, sind Trisomien 8 und 11 oder der Verlust des Y Chromosoms [132, 133]. Basierend auf der Methode der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) wurden die Chromosomen 8, 11, X und Y in unterschiedlichen Metaphasen visualisiert.



**Abbildung 2- 10. Beispiele von Metaphasen der Chromosomenanalyse** (Abbildung bereitgestellt von Chrombios). Die Chromosomen 8 (blau), 11 (grün), X (rot) und Y (cyan) wurden mit Sonden hybridisiert, die durch verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe markiert wurden. **A** Normale Metaphase. **B** und **C** Metaphasen mit Trisomie 8 (weiße Pfeile). **D** Metaphase mit Trisomie 8 durch ein Fusionsprotein (weiße Pfeile).

Abbildung 2-10 zeigt verschiedene Metaphasen exemplarisch. Die Resultate von jeweils ausgezählten 30 Metaphasen eines Zellklons sind in Tabelle 2-1 aufgelistet. Unter allen getesteten ES-Zellklonen wurden Chromosomenaberrationen detektiert. 93-100 % der untersuchten Metaphasen wiesen eine Trisomie 8 auf (Tab. 2-1 und Abb. 2-10 B, C und D). Abbildung 2-10 A zeigt eine normale Metaphase zum Vergleich.

**Tabelle 2- 1. Häufigkeit und Art der Chromosomenaberrationen in den getesteten Klonen**

Klon	Trisomie 8*	weitere Aberrationen
A2	97 %	nein
A3	93 %	nein
B6	90 %	nein
C3	97 %	nein
H6	100 %	metazentrisches Chromosom 8
Wildtyp	93 %	nein

\* (% von 30 ausgezählten Metaphasen)

Bereits in 93 % der wildtypischen ES-Zellen zeigte sich eine Trisomie 8. Da alle anderen ES-Zellklone aus diesen hervorgingen, wiesen sie einen entsprechend hohen Prozentsatz dieser Aneuploidie auf. Trisomie 8 ist zwar auf zellulärer Ebene tolerierbar, jedoch in einem sehr frühen Stadium der Embryonalentwicklung letal [134].

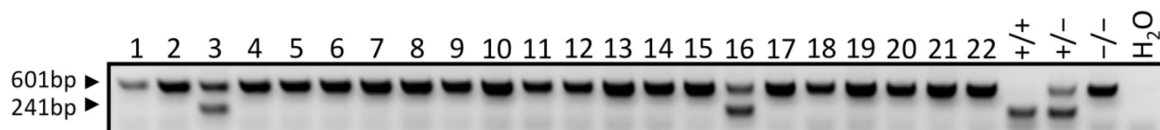
#### INJEKTIONSILANZ UND KEIMBAHNTRANSMISSION

Die schlechte Injektionsbilanz (Tab. 2-2) konnte durch die Befunde der Chromosomenanalyse erklärt werden, denn ES-Zellen mit einer Trisomie 8 haben nur ein geringes Potential zur Keimbahn Transmission [135].

**Tabelle 2- 2. Auflistung der Injektionsversuche**

Anzahl der Injektionen	13
genutzte Stammzellklone	A2, B5, H3, C3, A3
Anzahl der transferierten Blastozysten oder 8-Zellstadien	> 400
Anzahl der Ammen	> 33
Anzahl der Nachkommen	7 (davon alle mit 70-90 %igem Chimerismus)

Jedoch wurden unter den getesteten Metaphasen auch einige ES-Zellen mit normalem Karyotyp festgestellt. Die erfolgreiche Einnistung dieser führte schließlich zur Bildung von hochchimären Tieren und deren Rückkreuzung zu 7 Transgen-Transmissionen in der Folgegeneration, die durch Typisierungen von Schwanzbiopsien mittels Polymerasekettenreaktion (PCR: *Polymerase chain reaction*) nachgewiesen wurden. Das Prinzip der R26 PCR ist unter 5.4.1 beschrieben und durch Abbildung 5-2 dargestellt. Abbildung 2-11 zeigt exemplarisch die Ergebnisse der Biopsien 1-22 aus der R26 PCR. Hiervon wurden die Biopsien 3 und 16 positiv getestet (wildtypische Bande bei 601 bp, Bande nach KI bei 241 bp). Wildtypische DNA wurde als Negativkontrolle genutzt. Als homozygote (+/+) und heterozygote Kontrollen (+/-) diente DNA aus einem anderen R26 KI-Stamm. Mit den Nachkommen von Tier 16 aus einer Injektion von Klon A2 wurde hauptsächlich gearbeitet. Diese wurden während der Phänotypisierung parallel zu Tieren eines weiteren Stammvaters (3389) getestet. Da kein Unterschied zwischen beiden Linien festgestellt werden konnte (Daten nicht gezeigt), wurden die Resultate aus den Untersuchungen beider Linien im Folgenden zusammengefasst.



**Abbildung 2- 11. Genotypisierung zur Identifizierung der *Tcaim*-Transmission.** Das wildtypische Fragment hat eine Größe von 601 bp und das Fragment, welches die *Tcaim* Insertion detektiert, erscheint bei einer Größe von 241 bp. Wildtypische DNA diente als Negativkontrolle (-/-). Als homozygote (+/+) und heterozygote Kontrollen (+/-) diente DNA aus einem anderen R26 *knock-in* Stamm. Die Ladekontrolle ist mit H<sub>2</sub>O beschriftet.

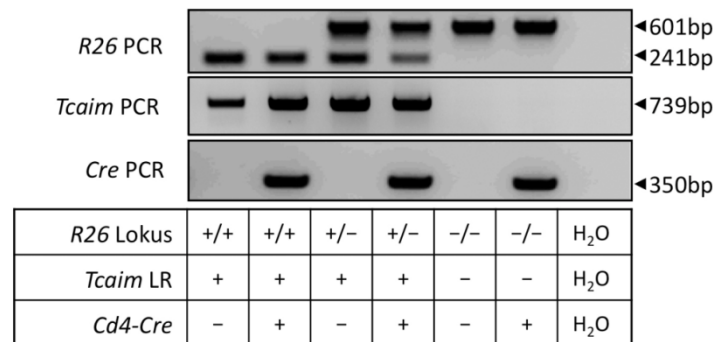
Die Insertion des *Tcaim* Leserahmens in den R26 Locus wurde ebenfalls mittels PCR überprüft. Primer und Amplifikationszeit wurden dabei so gewählt, dass nur der in den R26 Locus integrierte Leserahmen, nicht aber das endogene durch Introns unterbrochene Gen amplifiziert wurde. Abbildung 2-12 zeigt eine PCR von homozygoter, heterozygoter und

wildtypischer DNA. Nur bei den beiden erstgenannten Genotypen kam es zur Bildung eines Fragments der richtigen Größe (739 bp).

### ÜBERPRÜFUNG DER FUNKTIONALITÄT DER *TCAIM* KI MAUSLINIE

Die *Tcaim* KI Mauslinie wurde mit einer *Cre*-exprimierenden Mauslinie gekreuzt (vgl. Abb. 2-6). Diese Mauslinie besitzt als Transgen ein Konstrukt aus dem *Cd4*-Promoter und der Sequenz für *Cre* (*Cd4-Cre*) [136].

Nachkommen dieser Kreuzung können sechs unterschiedliche Genotypen annehmen (Abb. 2-12). *Cd4-Cre* wurde durch die Amplifikation eines 350 bp großen Fragments innerhalb des Transgens nachgewiesen. Da *Cd4-Cre* nicht auf homozygoten oder heterozygoten Zustand getestet werden kann, wurde im Folgenden nur zwischen *Cd4-Cre* und wildtypischem Genotyp unterschieden.



**Abbildung 2- 12. Genotypenverteilung der Kreuzung von *Tcaim* KI und *Cd4-Cre* Mäusen.** Der *Tcaim* KI konnte heterozygot (+/-) oder homozygot (+/+) vorliegen und wurde durch die R26 PCR detektiert. Eine für den *Tcaim* KI Leserahmen (*Tcaim* LR) spezifische PCR zeigte in Biopsien ein positives Signal, die auch positiv für einen mutierten R26 Lokus getestet werden konnten (*Tcaim* PCR). Wildtypische und hetero- bzw. homozygot R26-modifizierte Tiere konnten das *Cd4-Cre* Transgen tragen (*Cd4-Cre* PCR).

Tabelle 2-3 listet die genutzten Abkürzungen auf. In den folgenden Absätzen werden die Genotypen, die negativ für *Cd4-Cre* getestet wurden aber hetero- oder homozygot für die *R26-Tcaim*, zusammengefasst und mit dem Terminus *Tcaim*<sup>+</sup> abgekürzt.

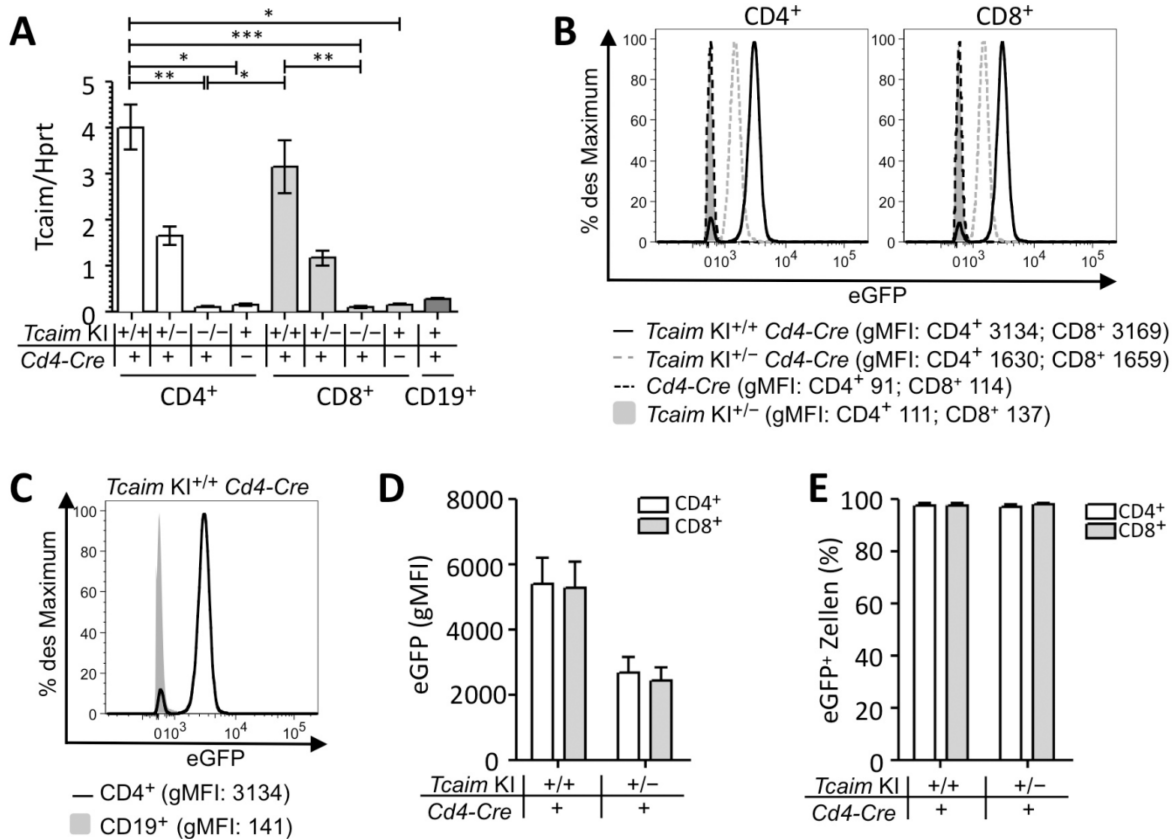
**Tabelle 2- 3. Auflistung der Genotypen und der genutzten Abkürzungen**

Genotyp R26-Lokus	Genotyp für <i>Cd4-Cre</i>	Verwendete Abkürzung
Wildtyp	Negativ getestet	wt
Wildtyp	<i>Cd4-Cre</i> positiv getestet	<i>Cd4-Cre</i>
*Heterozygot R26- <i>Tcaim</i>	Negativ getestet	<i>Tcaim</i> KI+/-
*Homozygot R26- <i>Tcaim</i>	Negativ getestet	<i>Tcaim</i> KI+/+
Heterozygot R26- <i>Tcaim</i>	<i>Cd4-Cre</i> positiv getestet	<i>Tcaim</i> KI+/- <i>Cd4-Cre</i>
Homozygot R26- <i>Tcaim</i>	<i>Cd4-Cre</i> positiv getestet	<i>Tcaim</i> KI+/+ <i>Cd4-Cre</i>

\* Beide Genotypen werden im Folgenden nicht unterschieden und als *Tcaim* KI<sup>+</sup> zusammengefasst.

Die *Tcaim*-Expression der verschiedenen Genotypen wurde durch eine quantitative Echtzeit-PCR bestimmt (für die Beschreibung des Prinzips siehe 5.5) und ist in Abbildung 2-

13 A im Verhältnis zum Bezugsgen *Hprt* dargestellt. *Tcaim* mRNA Level CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen homozygoter (*Tcaim* KI<sup>+/+</sup>*Cd4-Cre*) und heterozygoter KI Tiere (*Tcaim* KI<sup>+/-</sup>*Cd4-Cre*) stiegen im Vergleich zu den Kontrolltieren (*Cd4-Cre* und *Tcaim* KI<sup>+</sup>) stark an. Homozygote *Tcaim*-Überexpression in CD4<sup>+</sup> T-Zellen führte zu einem 26-34-fachen Anstieg des mRNA Level (34-fach in Bezug zu *Cd4-Cre* und 26-fach in Bezug zu *Tcaim* KI<sup>+</sup>). Innerhalb der CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulation wurde eine 18-29-fache Erhöhung detektiert (29-fach in Bezug zu *Cd4-Cre* und 18-fach in Bezug zu *Tcaim* KI<sup>+</sup>).



**Abbildung 2- 13. *Tcaim* mRNA und eGFP Level der unterschiedlichen Genotypen in CD4<sup>+</sup> T-, CD8<sup>+</sup> T- und CD19<sup>+</sup> B-Zellen.** **A** Angeführte Zellpopulationen wurden aus Milzzellsuspensionen isoliert, RNA gewonnen und anschließend in cDNA umgeschrieben. Relative RNA Level von *Tcaim* im Vergleich zu *Hprt* wurden für CD19<sup>+</sup> B-, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus *Tcaim* KI<sup>+/+</sup>*Cd4-Cre*, *Tcaim* KI<sup>+/-</sup>*Cd4-Cre*, *Cd4-Cre* und *Tcaim* KI<sup>+</sup> Tieren ermittelt (n = 4-6). **B** Die Histogramme zeigen Überlagerungen von CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen unterschiedlicher Genotypen (*Tcaim* KI<sup>+/+</sup>*Cd4-Cre* (schwarze, durchgehende Linie), *Tcaim* KI<sup>+/-</sup>*Cd4-Cre* (graue, unterbrochene Linie), *Cd4-Cre* (schwarze, unterbrochene Linie) und *Tcaim* KI<sup>+/-</sup> (ausgefüllt grau) hinsichtlich ihrer eGFP-Intensität (angegeben als gMFI von eGFP für CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen). **C** Überlagerung der eGFP-Intensität von CD4<sup>+</sup> T-Zellen (schwarze Linie) und CD19<sup>+</sup> B-Zellen (grau, ausgefüllt) aus *Tcaim*<sup>+/+</sup>*Cd4-Cre* Tieren (angegeben ist das gMFI von eGFP für CD4<sup>+</sup> T- und CD19<sup>+</sup> B-Zellen). **D** GMFI von eGFP von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus *Tcaim* KI<sup>+/+</sup>*Cd4-Cre* und *Tcaim* KI<sup>+/-</sup>*Cd4-Cre* Mäusen (n = 5-6). **E** *Egfp*-Expression in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus *Tcaim* KI<sup>+/+</sup>*Cd4-Cre* und *Tcaim* KI<sup>+/-</sup>*Cd4-Cre* Mäusen (n = 5-6). Balken repräsentieren Mittelwerte (M) ± SEM. Statistische Analysen wurden mittels Kruskal-Wallis-Test und *post-hoc* Dunns-Vergleich berechnet. Signifikanz ist in den Abbildungen dargestellt: \**p* ≤ 0,05; \*\**p* ≤ 0,01; \*\*\**p* ≤ 0,001.

Die geringe *Tcaim*-Expression in den CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus Kontrolltieren (*Cd4-Cre* und *Tcaim* KI<sup>+</sup>), sowie in CD19<sup>+</sup> B-Zellen aus *Tcaim* KI<sup>+</sup>*Cd4-Cre* deutet auf eine Cre-induzierte und zellspezifische Überexpression von *Tcaim* hin.

Ebenso wie die *Tcaim*-Expression, konnte auch die *Egfp*-Expression als Marker zur Funktionalität genutzt werden. Die *Egfp*-Expression verschiedener Genotypen wird exemplarisch in Abbildung 2-13 B für CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen gezeigt. Eine gesteigerte eGFP-Fluoreszenz ließ sich nur bei Zellen aus *Tcaim* KI<sup>+</sup>*Cd4-Cre* und *Tcaim* KI<sup>+</sup>*Cd4-Cre* Tieren zeigen. Die Zellspezifität zeigte sich bei einer Überlagerung von CD4<sup>+</sup> T- und CD19<sup>+</sup> B-Zellen aus einer *Tcaim* KI<sup>+</sup>*Cd4-Cre* Maus (Abb. 2-13 C: eGFP gMFI von CD4<sup>+</sup>: 3134; eGFP gMFI von CD19<sup>+</sup>: 141). Dies unterstützt die Daten aus den mRNA Messungen.

Homozygot *Tcaim*-überexprimierende CD4<sup>+</sup> T-Zellen zeigten im Vergleich zu heterozygoten ein annähernd doppelt so hohes *Tcaim* mRNA-Level (Abb. 2-13 A: Einheiten als Mittelwerte (M) ± SEM (*standard error of the mean*): homozygot:  $4,0 \pm 0,5$ ; heterozygot:  $1,7 \pm 0,2$ ). Dies galt auch für CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 2-13 A: Einheiten als M ± SEM: *Tcaim* KI<sup>+</sup>*Cd4-Cre*:  $3,2 \pm 0,6$ ; *Tcaim* KI<sup>+</sup>*Cd4-Cre*:  $1,2 \pm 0,2$ ). Ein Gendosis-Effekt zeigte sich ebenso in der Analyse der eGFP-Intensität (Abb. 2-13 D: eGFP gMFI als M ± SEM: CD4<sup>+</sup> *Tcaim* KI<sup>+</sup>*Cd4-Cre* T-Zellen:  $5389 \pm 813$ ; CD8<sup>+</sup> *Tcaim* KI<sup>+</sup>*Cd4-Cre* T-Zellen:  $5296 \pm 799$ ; CD4<sup>+</sup> *Tcaim* KI<sup>+</sup>*Cd4-Cre* T-Zellen:  $2676 \pm 481$ ; CD8<sup>+</sup> *Tcaim* KI<sup>+</sup>*Cd4-Cre* T-Zellen:  $2451 \pm 382$ ).

Das Einkreuzen von *Cd4-Cre* führte zu 97 % eGFP<sup>+</sup> Zellen innerhalb der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> *Tcaim* KI T-Zellpopulation (Abb. 2-13 E).

### 2.2.2 PHÄNOTYPISCHE CHARAKTERISIERUNG DER *TCAIM* KI MAUSLINIE

T-Zellvorläufer wandern aus dem Knochenmark in den Thymus ein und durchlaufen Selektionsschritte, die u. a. zu deren finaler Bestimmung in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen führen. Die Expression unterschiedlicher Oberflächenmarker charakterisiert verschiedene Entwicklungsstufen. Hinsichtlich der Expression von CD4 und CD8 können folgende Stadien unterteilt werden: CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (DN: doppeltnegativ), CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (DP: doppeltpositiv) und CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> einzelpositiv [137].

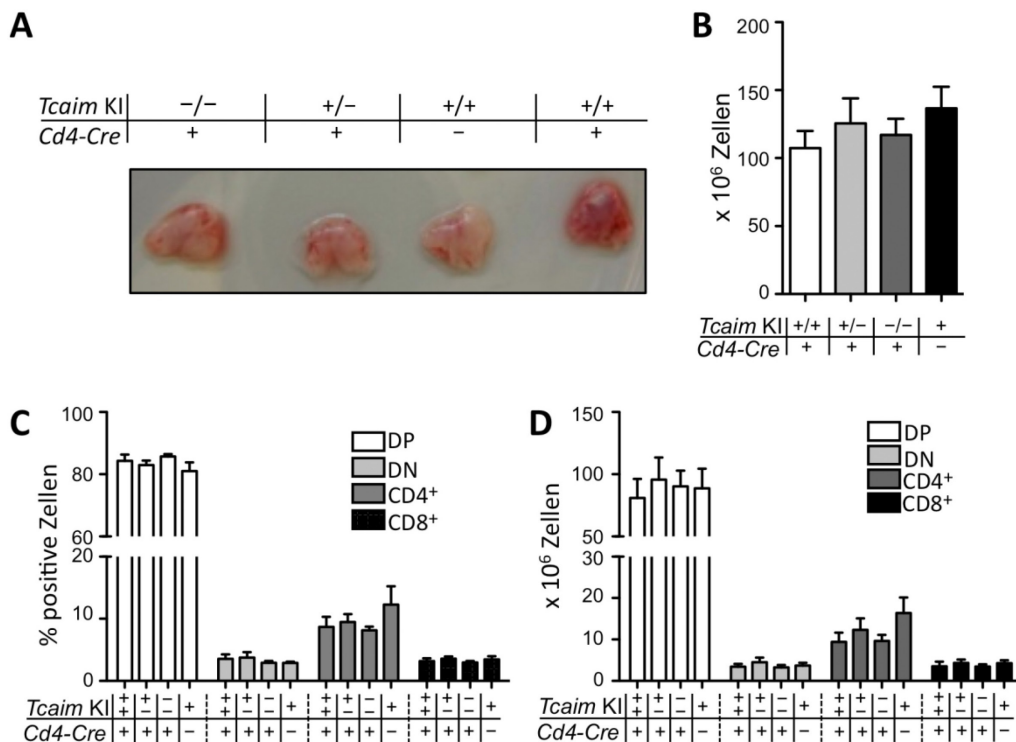
#### DER *TCAIM* KI HAT KEINEN EINFLUSS AUF DIE ZUSAMMENSETZUNG DER T-ZELLPOPULATIONEN IM THYMUS

Da die *Tcaim*-Überexpression schon während der frühen T-Zellentwicklung stattfindet, ist es möglich, dass sich schon zu diesem Zeitpunkt ein Phänotyp herausbildet. Die Bestimmung der Größe immunologischer Organe und deren Zellzahlen ist die erste Möglichkeit, um einen Einfluss von *TCAIM* zu untersuchen. Wie in Abbildung 2-14 zu sehen, ließen sich keine Unterschiede in der Größe der Thymi zwischen den einzelnen Gruppen feststellen (Abb. 2-14 A). Dies wurde auch durch die Erfassung der absoluten Thymozytenzahl bestätigt (Abb. 2-14 B).

Im nächsten Schritt wurde die Zusammensetzung des Thymus hinsichtlich DN, DP und CD4/CD8-einzelpositiven Zellen untersucht. Es konnten keine Auswirkungen der *Tcaim*-Überexpression festgestellt werden, die zu signifikanten Unterschieden in der Zusammensetzung dieser Zellpopulationen führen (Abb. 2-14 C). Ebenso konnten keine signifikanten Unterschiede in der absoluten Zellzahl dieser Populationen (bezogen auf lebende Zellen) zwischen *Tcaim*-überexprimierenden Tieren (*Tcaim* KI<sup>+</sup>*Cd4-Cre* und *Tcaim*



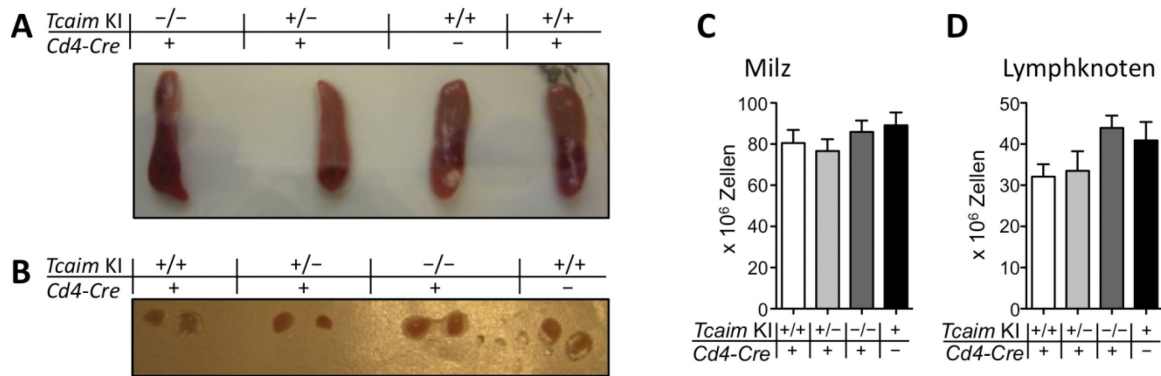
KI<sup>+/-</sup>-*Cd4-Cre*) und Kontrolltieren (*Cd4-Cre* und *Tcaim* KI<sup>+</sup>) beobachtet werden (Abb. 2-14 D). Von allen Messungen wurden tote Zellen und Doubletten ausgeschlossen (vgl. 5.10).



**Abbildung 2- 14. Vergleich der Organgrößen, absoluten Zellzahlen und Zusammensetzung der Thymi aus *Tcaim* KI und Kontrolltieren.** **A** Thymus von 11 Wochen alten Tieren eines Wurfes mit angegebenen Genotypen. **B** Anzahl der Zellen des Thymus von *Tcaim* KI<sup>+/+</sup>*Cd4-Cre*, *Tcaim* KI<sup>+/-</sup>*Cd4-Cre*, *Cd4-Cre* und *Tcaim* KI<sup>+</sup> Tieren. **C** und **D** Dargestellt sind relative (**C**) und absolute (**D**) Zellzahlen von Thymuszellen hinsichtlich ihrer CD4 und CD8 Oberflächenexpression. Folgende Gruppen wurden unterschieden: doppeltpositive (DP, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), doppeltnegative (DN, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) und einzelpositive Zellen (CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup>). Für alle Abbildungen gilt eine Stichprobengröße von n = 8-12. Balken repräsentieren Mittelwerte ± SEM. Statistische Analysen wurden durchgeführt mittels Kruskal-Wallis Test und *post-hoc* Dunns-Vergleich (innerhalb DP, DN, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>): n.s.

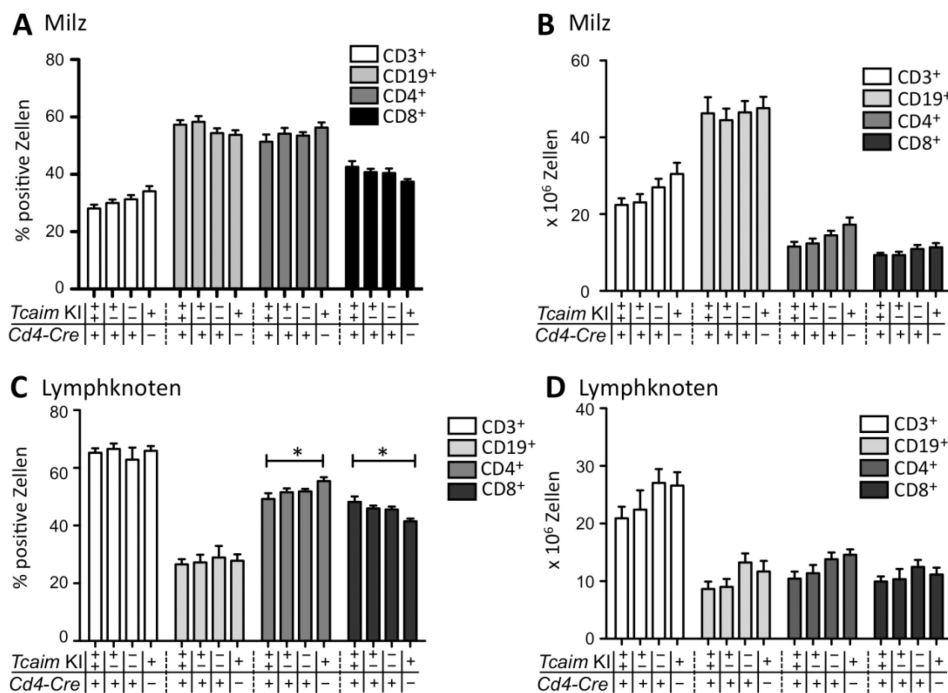
#### DER KI VON *TCAIM* HAT KEINEN EINFLUSS AUF DIE ZUSAMMENSETZUNG DER T-ZELLPOPULATIONEN IN MILZ UND LYMPHKNOTEN

Ebenso wie für Thymi wurden die Größen von Milzen und brachialen Lymphknoten von *Tcaim*-überexprimierenden Tieren (*Tcaim* KI<sup>+/+</sup>*Cd4-Cre*; *Tcaim* KI<sup>+/-</sup>*Cd4-Cre*) und Kontrolltieren (*Cd4-Cre*; *Tcaim* KI<sup>+</sup>) bestimmt. Dies zeigt Abbildung 2-15 A und B exemplarisch für Tiere eines Wurfes. Es konnten keine Unterschiede in der Größe der Organe festgestellt werden. Die absoluten Zellzahlen der Milz (bezogen auf lebende Zellen) zeigt Abbildung 2-15 C. Entsprechend zeigt Abbildung 2-15 D die absoluten Zellzahlen für Einzelzellsuspension von aufgearbeiteten Lymphknoten (brachiale, axillare, zervikale, lumbale, inguinale und mesenteriale). Die Ergebnisse der Organgrößen bestätigend, konnten keine signifikanten Unterschiede in der Zellzahl detektiert werden.



**Abbildung 2- 15. Vergleich der Organgrößen und absoluten Zellzahlen der Milz und Lymphknoten aus *Tcaim KI* und Kontrolltieren.** Milz (A) und brachiale Lymphknoten (B) von 11 Wochen alten Tieren eines Wurfs mit angegebenen Genotypen. Absolute Zellzahlen der Milz (C) und Lymphknoten (brachiale, axillare, zervikale, lumbale, inguinale und mesenteriale) (D) von *Tcaim KI*<sup>+/+</sup>*Cd4-Cre*, *Tcaim KI*<sup>+/-</sup>*Cd4-Cre*, *Cd4-Cre* und *Tcaim KI*<sup>+</sup> Tieren (n = 6-9, Balken repräsentieren Mittelwerte ± SEM, Kruskal-Wallis-Test mit *post-hoc* Dunns-Vergleich, p > 0,05, n.s.).

Des Weiteren wurden relative Zellzahlen von CD3<sup>+</sup> und CD19<sup>+</sup> Zellen in Milz (Abb. 2-16 A) und Lymphknoten (Abb. 2-16 C) sowie absolute Zellzahlen dieser Populationen bestimmt (Milz Abb. 2-16 B und Lymphknoten 2-16 D). Beides bezog sich auf eine Gesamtheit lebender Zellen.



**Abbildung 2- 16. Zusammensetzung der Milz und Lymphknoten von *Tcaim KI* und Kontrolltieren.** CD3<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> B-, CD4<sup>+</sup> T- und CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulationen von Milz in relativen Zahlen (A) und absoluten Zahlen (B) sowie von Lymphknoten in relativen (C) und absoluten Zahlen (D). Relative Zahlen der CD3<sup>+</sup> und CD19<sup>+</sup> Populationen beziehen sich auf lebende Zellen; relative Zahlen von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf die Gesamtheit von CD3<sup>+</sup> Zellen. Absolute Zellzahlen wurden berechnet, bezogen auf die Anzahl lebender Zellen (n = 6-9, Balken repräsentieren Mittelwerte ± SEM, Kruskal-Wallis-Test und *post-hoc* Dunns-Vergleich innerhalb der einzelnen Populationen: \*p ≤ 0,05).

*Tcaim* KI<sup>+/+</sup>*Cd4-Cre* Tiere zeigten eine Tendenz zu einer geringeren Anzahl an CD3<sup>+</sup> Zellen im Vergleich zu Kontrolltieren (*Cd4-Cre*; *Tcaim* KI<sup>+</sup>) (Abb. 2-16 A, B, D). Relative Anzahlen von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen beziehen sich auf eine Gesamtheit von CD3<sup>+</sup> Zellen nach deren Aufarbeitung. Hier zeigt sich die Tendenz zu einer geringeren Anzahl von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in *Tcaim* KI<sup>+/+</sup>*Cd4-Cre* Tieren in beiden Organen (Abb. 2-16 A, C), die auch in der Berechnung der absoluten Zellzahl zu sehen ist (Abb. 2-16 B, D). Entsprechend zeigen *Tcaim* KI Tiere eine Tendenz zu einer höheren Anzahl an CD8<sup>+</sup> T-Zellen. In der Darstellung der relativen Zellzahlen in Lymphknoten (Abb. 2-16 C) wird der Vergleich von *Tcaim* KI<sup>+/+</sup>*Cd4-Cre* und *Tcaim* KI<sup>+</sup> innerhalb der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen signifikant.

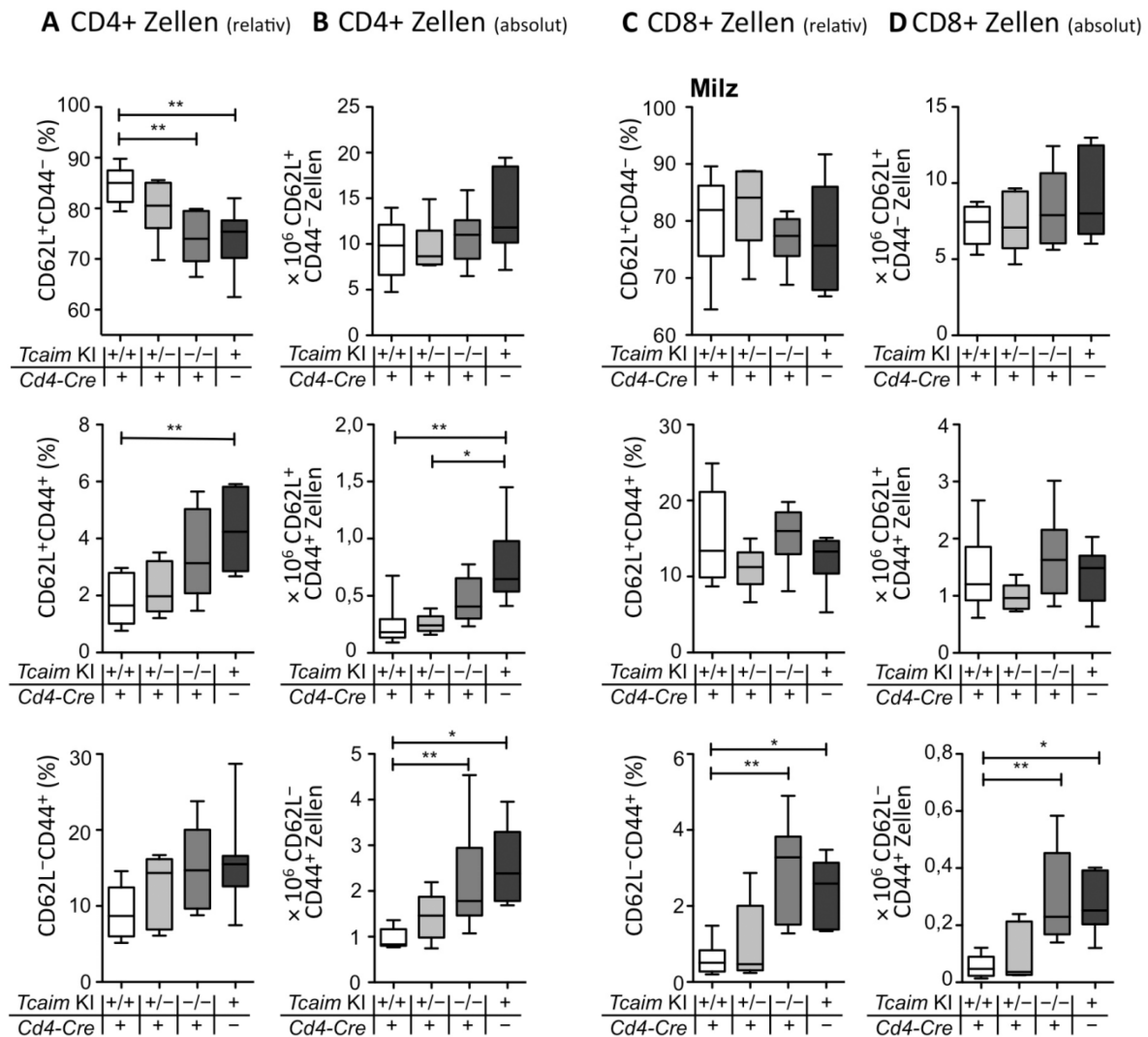
### 2.2.3 UNTERSUCHUNG VON T-ZELLSUBPOPULATIONEN IN *TCAIM* KI- UND KONTROLLTIEREN

Frühere Publikationen [54, 61] deuteten auf eine Beeinträchtigung der T-Zellaktivierung bei hohem *Tcaim*-Expressionslevel hin. Um diesem Aspekt nachzugehen, wurde die Expression der Oberflächenmarker CD44 und CD62L von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in naiven Tieren untersucht. Es lassen sich verschiedene Subklassen unterscheiden: naive (CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>) T-Zellen, aktivierte bzw. Gedächtnis-T-Zellen (CD62L<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup> und CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>; vgl. 1.3).

#### BESTIMMUNG VON CD4<sup>+</sup> UND CD8<sup>+</sup> NAIVEN UND SPONTAN ENTSTEHENDEN GEDÄCHTNIS-T-ZELLEN

Die Zusammensetzung der CD4<sup>+</sup> (Abb. 2-17 A) und der CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 2-17 C) aus der Milz wurden hinsichtlich der Oberflächenmarker CD62L und CD44 untersucht. Innerhalb der CD4<sup>+</sup> Population zeigte sich eine erhöhte Anzahl naiver T-Zellen (CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>) bei *Tcaim*-überexprimierenden Tieren (*Tcaim* KI<sup>+/+</sup>*Cd4-Cre*; *Tcaim* KI<sup>+/+</sup>*-Cd4-Cre*) im Vergleich zu Kontrolltieren (*Cd4-Cre*; *Tcaim* KI<sup>+</sup>). Entsprechend waren die Populationen der Gedächtnis-T-Zellen (CD62L<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>; CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>) in *Tcaim*-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen vermindert. Letzteres bestätigte sich auch in den absoluten Zellzahlen (Abb. 2-17 B).

Innerhalb der CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigten sich ausschließlich in der CD62L<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup> Population Unterschiede zwischen *Tcaim*-überexprimierenden- und Kontrollzellen (Abb. 2-17 C). Dies bestätigte sich auch in der Berechnung der absoluten Zellzahl (Abb. 2-17 D).



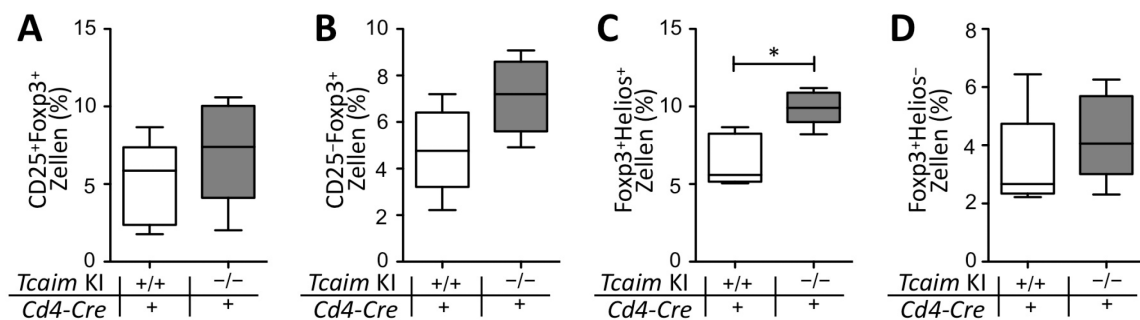
**Abbildung 2- 17. Expression der Oberflächenmarker CD44 und CD62L in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz naiver Tiere.** **A** CD62L und CD44 einzel- und doppelpositive Zellen bezogen auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Mäusen mit angegebenen Genotypen. **B** Absolute Zellzahlen von CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>, CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> und CD62L<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup> T-Zellen bezogen auf lebende Zellen aus Mäusen mit angegebenen Genotypen. **C** CD62L und CD44 einzel- und doppelpositive Zellen bezogen auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus Mäusen mit angegebenen Genotypen. **D** Absolute Zellzahlen von CD8<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>, CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> und CD62L<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup> Zellen bezogen auf lebende Zellen aus Mäusen mit angegebenen Genotypen. Für alle Abbildungen gilt eine Stichprobengröße von *n* = 6-9. Box-Whisker-Plots repräsentieren Median, oberes und unteres Quartil. Whiskers geben Maximum und Minimum an. Statistische Analysen wurde durchgeführt mittels Kruskal-Wallis-Test und *post-hoc* Dunns-Vergleich: \**p* ≤ 0,05; \*\**p* ≤ 0,01.

#### BESTIMMUNG VON T<sub>Regs</sub> IN DER MILZ VON *TCAIM* KI UND KONTROLLTIEREN

Der vorangegangene Abschnitt beschäftigte sich mit dem Einfluss von TCAIM auf die Zusammensetzung von Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen in naiven Tieren. Der Einfluss von TCAIM auf die Bildung von T<sub>Regs</sub>, einer speziellen CD4<sup>+</sup> T-Zellsubpopulation (vgl. 1.2), soll in diesem Abschnitt untersucht werden.

In den Milzen naiver *Tcaim* KI Mäuse wurde eine verminderte Anzahl CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Zellen im Vergleich zu *Cd4-Cre* Kontrolltieren (Abb. 2-18 A) detektiert. Dies bestätigte sich auch für die CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (Abb. 2-18 B).

Auch die Expression von Helios, einem Transkriptionsfaktor, der natürliche regulatorische T-Zellen (nT<sub>Regs</sub>) charakterisieren soll, wurde in Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen aus *Tcaim* KI Tieren im Vergleich zu Zellen aus *Cd4-Cre* Tieren bestimmt. Abbildung 2-18 C zeigt ein geringeres Verhältnis von Foxp3<sup>+</sup>Helios<sup>+</sup> Zellen ( $p \leq 0,05$ ) innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation von *Tcaim* KI- im Vergleich zu Kontrolltieren. Ebenso war das Verhältnis von Foxp3<sup>+</sup>Helios<sup>-</sup> Zellen in *Tcaim* KI-Tieren beeinträchtigt. Der Vergleich beider Gruppen erreichte jedoch keine Signifikanz (Abb. 2-18 D).



**Abbildung 2- 18. Verteilung von T<sub>Regs</sub> in der Milz von *Tcaim* KI und Kontrolltieren.** A CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, B CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>+</sup>, C Foxp3<sup>+</sup>Helios<sup>+</sup> und D Foxp3<sup>+</sup>Helios<sup>-</sup> Zellen innerhalb von CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz von *Tcaim* KI<sup>+/+</sup>*Cd4-Cre* im Vergleich zu *Cd4-Cre* Mäusen. Für alle Abbildungen gilt eine Stichprobengröße von n = 5. Box-Whisker-Plots repräsentieren Mediane, oberes und unteres Quartil. Whiskers geben Maximum und Minimum an. Statistische Analysen wurden mittels Mann-Whitney-U-Test durchgeführt, \* $p \leq 0,05$ .

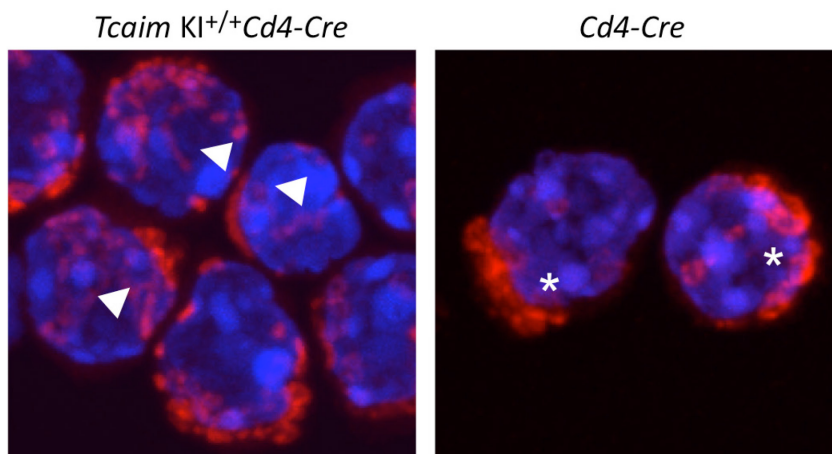
#### 2.2.4 UNTERSUCHUNG DER MITOCHONDRIEN VON *TCAIM*-ÜBEREXPRIMIERENDEN CD4<sup>+</sup> T-ZELLEN

Eine zunehmende Anzahl von Publikationen weist auf die Wichtigkeit von Mitochondrien während der T-Zellaktivierung hin (vgl. 2.1.3). Da TCAIM mitochondrial lokalisiert ist [61], macht dies die Organellen selbst, sowie die von ihnen ausgehenden physiologischen Prozesse, zum Ausgangspunkt der folgenden Untersuchungen.

##### TCAIM-ÜBEREXPRIMIERENDE ZELLEN ZEIGEN EINE VERRINGERTE MITOCHONDRIALE FISSION

Zwar unterscheidet sich die Morphologie von Mitochondrien verschiedener Zelltypen, oft liegen sie jedoch als tubuläre Strukturen in der Zelle vor und sind mit dem ER verknüpft [64, 66]. Wie bereits beschrieben, führt eine T-Zellaktivierung zu einer Verkürzung der Mitochondrien und zu deren Rekrutierung hin zur immunologischen Synapse [83].

Sollte TCAIM die T-Zellaktivierung beeinträchtigen, war es deshalb zunächst interessant, ob dies durch eine Veränderung in der mitochondrialen Morphologie geschieht. CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz von *Tcaim* KI<sup>+/+</sup>*Cd4-Cre* und *Cd4-Cre* Mäusen wurden 24 h polyklonal stimuliert, mit dem *MitoTracker CMXRos* gefärbt und mikroskopiert. Wie in Abbildung 2-19 zu sehen ist, akkumulierten Mitochondrien von Kontrollzellen an fokalen Stellen direkt unterhalb der Zelloberfläche. Zudem sind kaum längliche tubuläre Strukturen sondern eher kurze Fragmente zu detektieren. Bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus *Tcaim* KI<sup>+/+</sup>*Cd4-Cre* Tieren zeigte sich dies nicht im gleichen Ausmaß. Hier traten Mitochondrien als lange tubuläre Strukturen im Zellinneren auf.



**Abbildung 2- 19. Morphologie der Mitochondrien von aktivierten *Tcaim*-überexprimierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen und Kontrollzellen.** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus *Tcaim* KI<sup>+/+</sup>Cd4-Cre und *Cd4-Cre* Mäusen, die 24 h mit  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 stimuliert wurden. Markiert sind tubuläre (Pfeil) und verkürzte periphere Mitochondrien (Stern). Mitochondrien wurden mit MitoTracker CMXRos (rot) und Zellkerne mit DAPI (blau) angefärbt und sind als Überlagerungen in einer 630-fachen Vergrößerung gezeigt. Die Aufnahme entstand in Kooperation mit Dr. Michael Schumann (Institut für klinische Physiologie, Charité Berlin) und von ihm freundlicherweise bereitgestellt.

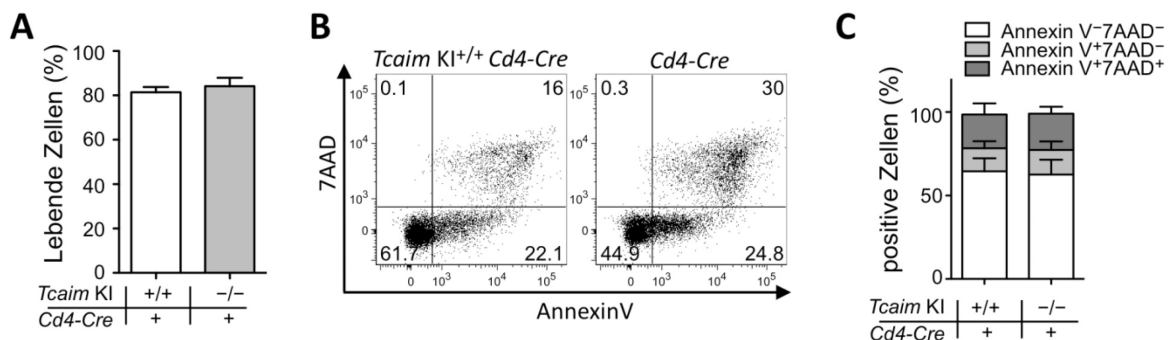
#### EINE KONSTANTE *TCAIM*-EXPRESSION FÜHRT NICHT ZU EINER GESTEIGERTEN APOPTOSE

Mitochondrien können durch die Freisetzung von Cytochrom c und proapoptotischen Faktoren den intrinsischen Weg der Apoptose auslösen [138]. Daher wurde untersucht, ob eine Überexpression von *Tcaim* zu einer verstärkten Apoptose und vermehrten Zelltod führt. Wie unter 2.2.3 beschrieben, besitzen *Tcaim* KI<sup>+/+</sup>Cd4-Cre Mäuse eine höhere Anzahl naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen verglichen mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus *Cd4-Cre* Mäusen. Um beiden Kulturen den gleichen Ausgangspunkt hinsichtlich des Aktivierungsstatus und damit auch der Apoptoseinduktion zu geben, wurden die Zellen zuvor zu einer naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation sortiert, die folgendermaßen definiert wurde: CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>schwach</sup>CD45RB<sup>hoch</sup>. Zusätzlich wurden *Tcaim* KI<sup>+/+</sup>Cd4-Cre Zellen zu reinen eGFP<sup>+</sup> Zellen sortiert (vgl. 5.9). Naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden zusammen mit allogenen LPS-gereiften BMDCs (*bone marrow-derived dendritic cells*) von BALB/c Mäusen für 5 Tage kultiviert und anschließend die Anzahl lebender Zellen durch eine Lebend/Tot-Färbung ermittelt (vgl. 5.10.2). Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl lebender CD4<sup>+</sup> T-Zellen zwischen Kokulturen beider Gruppen festgestellt werden (Abb. 2-20 A: % lebende CD4<sup>+</sup> T-Zellen als M  $\pm$  SEM: *Tcaim* KI<sup>+/+</sup>Cd4-Cre: 81,4 %  $\pm$  2,4; *Cd4-Cre*: 84,1 %  $\pm$  3,8).

Um innerhalb der Zellfraktion zwischen apoptotischen und nicht-apoptotischen Zellen zu unterscheiden wurde ebenfalls die Oberflächenexpression von Phosphatidylserin und die Membranintegrität bestimmt [139]. Annexin V bindet an Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche, welches in lebenden Zellen auf der intrazellulären Seite der Membran lokalisiert ist, bei der Induktion von Apoptose jedoch auf die äußere Membranseite transloziert [140]. 7-AAD interkaliert zwischen Nukleinbasen, kann aber nur durch nicht intakte Zellwände dringen. Dies gilt für spät-apoptotische und nekrotische Zellen [140, 141]. Es werden deshalb folgende Populationen unterschieden: lebende nicht-apoptotische Zellen

(Annexin V-7AAD<sup>-</sup>), lebende früh-apoptotische Zellen (Annexin V<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup>) und tote spät-apoptotische oder nekrotische Zellen (Annexin V<sup>+</sup>7AAD<sup>+</sup>).

Nach 5-tägiger Kokultivierung mit allogenen BMDCs konnte keine verstärkte Tendenz zur Apoptose bei *Tcaim*-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen beobachtet werden (Abb. 2-20 C: % CD4<sup>+</sup> T-Zellen als M ± SEM: *Tcaim* KI<sup>+/+</sup>*Cd4-Cre* nicht-apoptisch: 20,3 % ± 6,7; früh-apoptotisch: 13,7 % ± 4,2; spät-apoptotisch/tot: 64,6 % ± 7,7; *Cd4-Cre*: nicht-apoptisch: 21,7 % ± 4,2; früh-apoptotisch: 14,8 % ± 5,1; spät-apoptotisch/tot: 62,6 % ± 8,9). In zwei von drei Experimenten zeigte sich dagegen eine reduzierte Anzahl spät-apoptotischer, toter Zellen infolge einer *Tcaim*-Überexpression (Abb. 2-20 B: *Tcaim* KI<sup>+/+</sup>*Cd4-Cre*: 16 %, *Cd4-Cre*: 30 %).

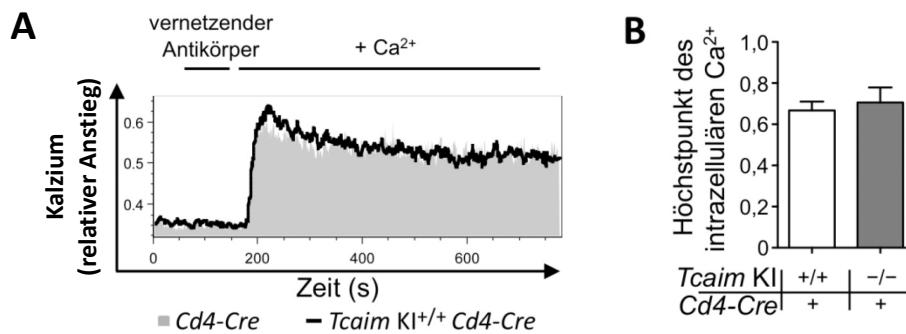


**Abbildung 2- 20. Zelltod und Apoptose in *Tcaim*-überexprimierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen und Kontrollzellen.** Naiv-sortierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen von *Tcaim* KI<sup>+/+</sup>*Cd4-Cre* oder *Cd4-Cre* Mäusen wurden für 5 Tage mit allogenen BMDCs kultiviert. **A** Anzahl lebender CD4<sup>+</sup> T-Zellen angegebenen Genotyps nach 5-tägiger Kokultivierung (n = 5, Balken repräsentieren Mittelwerte (M) ± SEM, Mann-Whitney-U-Test, n.s.). **B** Durchflusszytometrische Aufnahme und **C** statistische Zusammenfassung der Bestimmung von Annexin V auf der Zelloberfläche und der Durchlässigkeit von 7AAD in CD4<sup>+</sup> T-Zellen angegebenen Genotyps nach 5-tägiger Kokultivierung (n = 3, Balken repräsentieren Mittelwerte (M) ± SEM, Mann-Whitney-U-Test innerhalb der einzelnen Zellpopulationen, n.s.).

### MESSUNG DES KALZIUMEINSTROMS NACH T-ZELLREZEPTOR VERMITTELTEN STIMULATION

Eine T-Zellaktivierung bewirkt eine gesteigerte mitochondriale Fission und eine Rekrutierung zur immunologischen Synapse [83]. Die veränderte mitochondriale Lokalisation trägt entscheidend zur Aufrechterhaltung der Signalstärke bei, indem das einströmende Kalzium gepuffert und dadurch eine Kalzium-vermittelte Inaktivierung der CRAC-Kanäle vermieden wird (vgl. 2.1.3).

Um zu untersuchen, ob die Überexpression von *Tcaim* eine Auswirkung auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration hat, wurden Milzzellen von *Tcaim* KI<sup>+/+</sup>*Cd4-Cre* und *Cd4-Cre* Mäusen im selben Verhältnis gemischt und mit einem kalziumsensitiven Farbstoff (Indo-1) beladen. Die Zugabe eines vernetzenden Antikörpers und Kalzium zu den zuvor mit αCD3-inkubierten Zellen führte zur Zellaktivierung und Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentration, was eine Veränderung der Fluoreszenzeigenschaften des Farbstoffs bewirkte [142]. Abbildung 2-21 A zeigt exemplarisch die Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentration nach Stimulation von *Tcaim*-überexprimierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen und Kontrollzellen. Es konnten keine Unterschiede in Folge der *Tcaim*-Überexpression detektiert werden, weder in der Dauer (Abb. 2-21 A, exemplarisch) noch im Höchstwert des Kalziumeinstroms (Abb. 2-21 B: Einheiten als M ± SEM: *Tcaim* KI<sup>+/+</sup>*Cd4-Cre*: 0,67 ± 0,04; *Cd4-Cre*: 0,71 ± 0,07; n.s.).

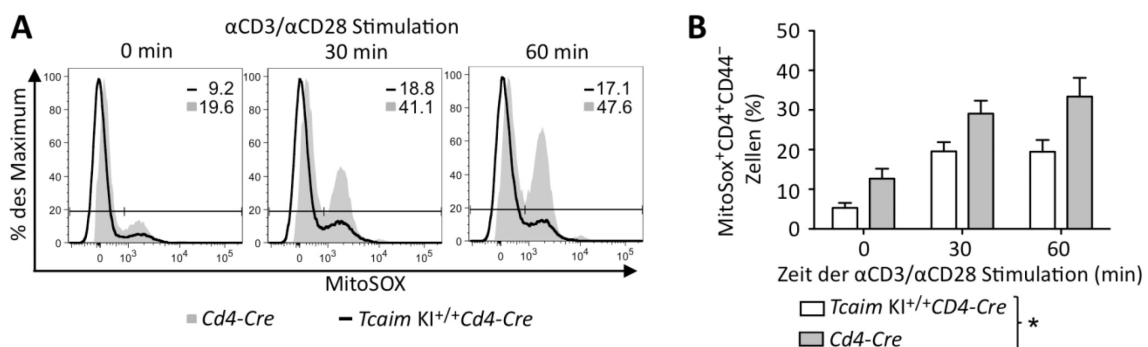


**Abbildung 2- 21. Untersuchungen des Kalziueinstroms nach T-Zellstimulation.** **A** Exemplarische Messung des intrazellulären Kalziums (Änderung der Fluoreszenz nach dem Beladen mit Indo-1) nach  $\alpha$ CD3-vermittelter Stimulation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus *Tcaim* KI<sup>+/+</sup>*Cd4-Cre* (schwarze Linie) oder *Cd4-Cre* (graue Füllung) Mäusen. **B** Zusammenfassung des maximalen Kalziueinstroms dieser Messungen (n = 3, Balken repräsentieren Mittelwerte (M)  $\pm$  SEM, Mann-Whitney-U-Test: n.s.).

#### DIE *TCAIM*-EXPRESSION REDUZIERT DIE BILDUNG VON TZR-INDUZIERTEN mROS IN CD4<sup>+</sup> T-ZELLEN

mRos entstehen u.a. als Nebenprodukt der Zellatmung. Zunächst als zellschädigende Metabolite beschrieben, zeigt eine zunehmende Anzahl neuerer Publikationen ihren positiven Einfluss auf die zelluläre Signaltransduktion und beschreibt sie sogar als sekundäre Botenstoffe [7, 48].

Deshalb wurde im Folgenden die mROS-Produktion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus *Tcaim* KI Mäusen untersucht. Die mROS-Produktion konnte durch die Nutzung des Superoxid-spezifischen Markers MitoSOX bestimmt werden. Um auszuschließen, dass dieser Effekt durch die unterschiedliche Zahl an Gedächtnis-T-Zellen verursacht wird, wurden die Messungen auf CD44-CD4<sup>+</sup> T-Zellen bezogen. CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus *Tcaim* KI<sup>+/+</sup>*Cd4-Cre* Mäusen zeigten eine deutlich geringere mROS-Produktion im Vergleich zu CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus *Cd4-Cre* Mäusen (Abb. 2-22 A: MitoSOX<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach 60 min Stimulation: *Tcaim* KI<sup>+/+</sup>*Cd4-Cre*: 17,1 %; *Cd4-Cre* T-Zellen: 47,6 %).



**Abbildung 2- 22. Vergleich der mROS Produktion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus *Tcaim* KI und Kontroll-Mäusen.**

**A** Exemplarische Messung der  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28-induzierten mROS Bildung von CD4<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup> T-Zellen aus *Tcaim* KI<sup>+/+</sup>*Cd4-Cre* (schwarze Linie) oder *Cd4-Cre* (graue Füllung) Mäusen nach angegebenen Zeiten. Angegeben ist die Anzahl MitoSOX<sup>+</sup> Zellen in % bezogen auf CD4<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup> T-Zellen. **B** Statistische Zusammenfassung der mROS Produktion in unstimulierten Zellen oder nach 30, 60 und 120 min  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28-vermittelter Stimulation (n = 5; Balken repräsentieren Mittelwerte (M)  $\pm$  SEM, zweifaktorielle ANOVA: Unterschiede zwischen den Gruppen: \*p  $\leq$  0,05; Unterschiede über die Zeit: \*\*\*p  $\leq$  0,001. Es konnte keine Interaktion zwischen beiden Haupteffekten detektiert werden.).



Eine zweifaktorielle ANOVA bestätigt den signifikanten Unterschied zwischen der mROS-Bildung von CD4<sup>+</sup> Zellen aus *Tcaim*-überexprimierenden und Kontrolltieren ( $p \leq 0,05$ ). Des Weiteren erreichten CD4<sup>+</sup> *Tcaim* KI-Zellen bereits ein Plateau nach 30 min, wohingegen die Bildung von mROS in Kontrollzellen noch nach 60 min anstieg (Abb. 2-22 B: % MitoSOX+CD4<sup>+</sup> T-Zellen als M  $\pm$  SEM: *Tcaim* KI<sup>+/+</sup>*Cd4-Cre*, 30 min: 19,7 %  $\pm$  2,3; 60 min: 19,5 %  $\pm$  3,9; *Cd4-Cre*, 30 min: 29,2 %  $\pm$  3,2; 60 min: 33,6 %  $\pm$  4,7).

### 2.2.5 AUSWIRKUNGEN DER *TCAIM*-EXPRESSION AUF DIE AKTIVIERUNG VON CD4<sup>+</sup> T-ZELLEN

Der folgende Abschnitt beschäftigt sich mit der Frage, wie sich eine verminderte Bildung von mROS in Folge einer konstanten *Tcaim*-Expression auf die Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen auswirkt. Wie bereits für die Apoptose-Messungen beschrieben, wurden die CD4<sup>+</sup> T-Zellen vor der allogenen Kokultur mit BMDCs zu einer naiven Population durchflusszytometrisch sortiert, um einen vergleichbaren Ausgangspunkt hinsichtlich der Zellaktivierung zu ermöglichen (vgl. 5.9).

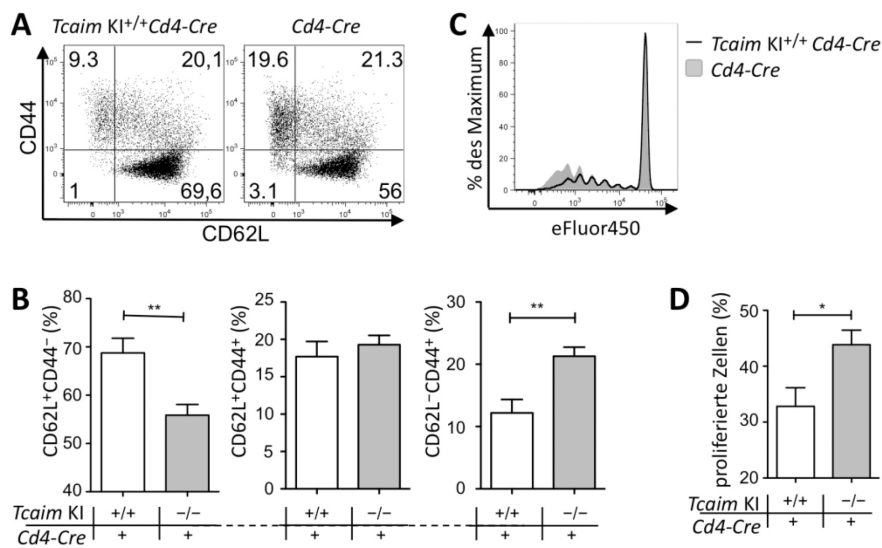
#### EINE KONSTANTE *TCAIM*-EXPRESSION VERMINDERT DIE AKTIVIERUNG VON CD4<sup>+</sup> T-ZELLEN *IN VITRO*

CD62L und CD44 werden im murinen System als Marker genutzt, um das Aktivierungsprofil von T-Zellen zu beschreiben. Wie in Abbildung 2-23 A exemplarisch dargestellt, zeigten CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus *Tcaim* KI<sup>+/+</sup>*Cd4-Cre* Mäusen nach 5-tägiger allogener Kokultur eine verminderte Anzahl an CD62L-CD44<sup>+</sup> Zellen verglichen mit CD4<sup>+</sup> Zellen aus *Cd4-Cre* Kontroll-Mäusen (Abb. 2-23 B, letztes Diagramm: % CD62L-CD44<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen als M  $\pm$  SEM: *Tcaim* KI<sup>+/+</sup>*Cd4-Cre*: 12,2 %  $\pm$  2,1; *Cd4-Cre*: 21,3 %  $\pm$  3,8;  $p \leq 0,01$ ).

Infolgedessen war die Population naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen, definiert als CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>, signifikant erhöht (Abb. 2-23 B, erstes Diagramm: % CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen als M  $\pm$  SEM: *Tcaim* KI<sup>+/+</sup>*Cd4-Cre*: 68,8 %  $\pm$  3,1; *Cd4-Cre*: 55,9 %  $\pm$  32,2;  $p \leq 0,01$ ). In der Anzahl CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> Zellen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen beobachtet werden (Abb. 2-23 B, mittleres Diagramm: % CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen als M  $\pm$  SEM: *Tcaim* KI<sup>+/+</sup>*Cd4-Cre*: 17,7 %  $\pm$  2,0; *Cd4-Cre*: 19,3 %  $\pm$  3,3;  $p = 0,9$ ).

#### DIE *TCAIM*-EXPRESSION VERMINDERT DIE PROLIFERATION VON ALLO-REAKTIVEN CD4<sup>+</sup> T-ZELLEN

Ein weiterer Parameter, der in diesem Zusammenhang untersucht wurde, war die Zellproliferation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen induziert durch allogene BMDCs. Hierzu wurden die CD4<sup>+</sup> T-Zellen vor der Kokultur mit einem Farbstoff (eFluor450) beladen. Dieser Farbstoff bindet kovalent an primäre Amine und verdünnt sich mit jeder Zellteilung, sodass man eine Abnahme der Fluoreszenzintensität nach jeder Zellteilung beobachten kann. Abbildung 2-23 C zeigt exemplarisch eine Überlagerung der Zellproliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus *Tcaim* KI<sup>+/+</sup>*Cd4-Cre* und *Cd4-Cre* Mäusen nach 5-tägiger Alloaktivierung. Kokulturen mit CD4<sup>+</sup> *Tcaim* KI<sup>+/+</sup>*Cd4-Cre* T-Zellen zeigten eine signifikant verminderte Proliferation verglichen mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus *Cd4-Cre* Mäusen (Abb. 2-23 D: % proliferierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen als M  $\pm$  SEM: *Tcaim* KI<sup>+/+</sup>*Cd4-Cre*: 32,8 %  $\pm$  3,3; *Cd4-Cre*: 43,8 %  $\pm$  2,6;  $p \leq 0,05$ ).

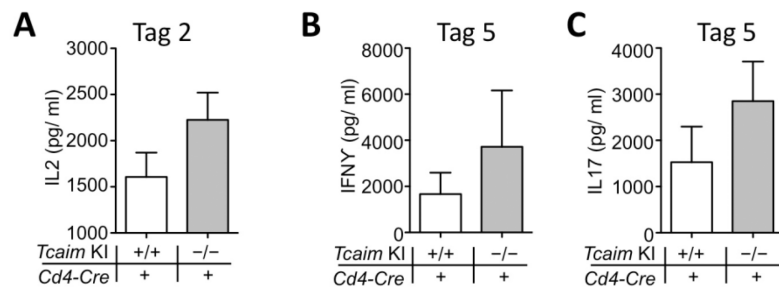


**Abbildung 2- 23. Aktivierung und Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus *Tcaim* KI<sup>+/+</sup>*Cd4-Cre* und *Cd4-Cre* Mäusen nach allogener Kokultur.** **A** Repräsentative Darstellung der Verteilung der Aktivierungsmarker CD62L und CD44 auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach allogener Kokultur und **B** die Zusammenfassung mehrerer Experimente im Balkendiagramm. **C** Repräsentative durchflusszytometrische Darstellung der Proliferation (gemessen als Abnahme des Markers eFluor450) und **D** die Zusammenfassung mehrerer Experimente im Balkendiagramm. Balken repräsentieren Mittelwerte (M) ± SEM bei einer Stichprobengröße von n = 7, Statistische Analysen wurden berechnet mittels Mann-Whitney-U-Test: \*p ≤ 0,05, \*\*p ≤ 0,01).

#### EINE KONSTANTE *TCAIM*-EXPRESSION VERMINDELT DIE ZYTOKINSEKRETION VON ALLOREAKTIVEN CD4<sup>+</sup> T-ZELLEN

IL-2 ist einer der wichtigsten Wachstumsfaktoren für T-Zellen und eines der ersten Zytokine, das von aktivierten T-Zellen gebildet wird. Die verminderte Proliferation der *Tcaim*-überexprimierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen ließ vermuten, dass diese Zellen auch eine verminderte Expression von IL-2 aufweisen könnten. Zu diesem Zweck wurde die Menge an IL-2 im Überstand zwei Tage nach allogener Kokultur durchflusszytometrisch ermittelt (vgl. 5.10.7). CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus *Tcaim* KI<sup>+/+</sup>*Cd4-Cre* Mäusen wiesen im Überstand eine geringere IL-2 Konzentration verglichen mit *Cd4-Cre* Mäusen auf (Abb. 2-24 A: IL-2 als M ± SEM: *Tcaim* KI<sup>+/+</sup>*Cd4-Cre*: 1607 pg/ml ± 263; *Cd4-Cre*: 2225 pg/ml ± 295).

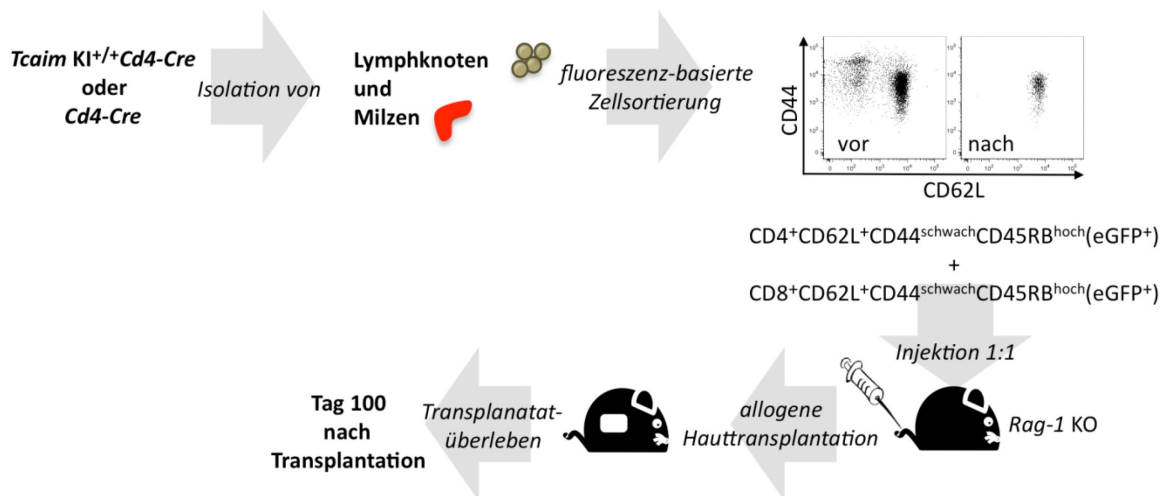
Um festzustellen, ob der KI von *Tcaim* die TH-Zelldifferenzierung hemmt, wurden die Zytokine IFN-γ, IL-17, IL-10, IL-4 und Tumornekrosefaktor-α TNF-α nach 5 Tagen bestimmt. Sowohl IL-10 als auch IL-4 konnten nicht detektiert werden. TNF-α konnte nur in wenigen Experimenten detektiert werden, hier waren allerdings keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen zu sehen (nicht gezeigt). Die Resultate für IFN-γ und IL-17 sind in Abbildung 2-24 B und C dargestellt. Wie auch für IL-2 beschrieben, zeigten Kulturen mit *Tcaim* KI-Zellen eine verminderte Expression dieser Zytokine (Zytokin als M ± SEM *Tcaim* KI<sup>+/+</sup>*Cd4-Cre* (IFN-γ) 1665 pg/ml ± 932; *Cd4-Cre* (IFN-γ) 3719 pg/ml ± 2444, p = 0,39; *Tcaim* KI<sup>+/+</sup>*Cd4-Cre* (IL-17) 1528 pg/ml ± 770; *Cd4-Cre* (IL-17) 2851 pg/ml ± 857, p = 0,18). Durch eine hohe Variabilität zwischen den einzelnen Experimenten konnte keine Signifikanz erreicht werden.



**Abbildung 2- 24. Bestimmung der Zytokine IL-2, IL-17 und IFN- $\gamma$  im Überstand von allogenen Kokulturen mit *Tcaim* KI<sup>+/+</sup>*Cd4-Cre* oder *Cd4-Cre* CD4<sup>+</sup> T-Zellen.** Durchflusszytometrische Bestimmung der IL-2 Menge (A) im Überstand nach 2-tägiger (n = 5; Mann-Whitney-U-Test: n.s.) bzw. IFN- $\gamma$  (B) und IL-17 Menge (C) im Überstand nach 5-tägiger allogener Kokultur (B und C: n = 6; Mann-Whitney-U-Test: n.s.). Balken repräsentieren Mittelwerte (M)  $\pm$  SEM.

### 2.2.6 AUSWIRKUNGEN DER TCAIM-EXPRESSION WÄHREND EINER ALLOGENEN HAUTTRANSPLANTATION

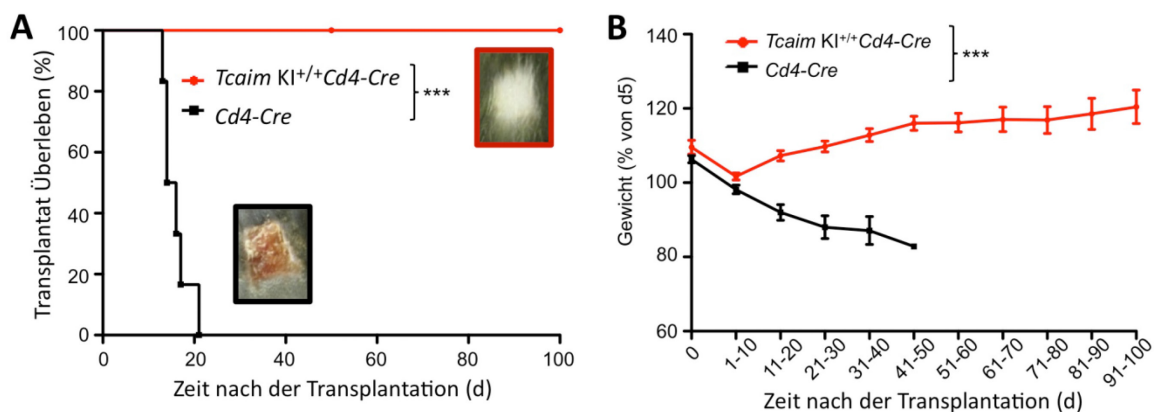
Die Ergebnisse der allogenen Kokultur warfen die Frage auf, ob die mit der *Tcaim*-Überexpression einhergehende verminderte Zellaktivierung, auch *in vivo* zu einer verminderten Abstoßung und damit einer Verlängerung des Transplantat-Überlebens führt. Um dies zu untersuchen, wurden *Rag-1* (*recombination activating gene-1*) KO Mäuse mit jeweils  $3 \times 10^5$  naiv-sortierten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen rekonstituiert.



**Abbildung 2- 25. Schema zum experimentellen Aufbau der allogenen Hauttransplantation.** Zellen aus Milz und Lymphknoten von *Tcaim* KI<sup>+/+</sup>*Cd4-Cre* und *Cd4-Cre* Tieren wurden isoliert und zu folgendem Profil sortiert: CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> und CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>schwach</sup>CD45RB<sup>hoch</sup>. Zellen aus *Tcaim* KI<sup>+/+</sup>*Cd4-Cre* Tieren wurden außerdem noch zu reinen eGFP<sup>+</sup> Zellen sortiert. Je  $3 \times 10^5$  CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen der jeweiligen Tiere wurden gemischt und in die Schwanzvene von C57BL/6 *Rag-1* KO Tieren injiziert. 1-2 Tage später erfolgte die Transplantation von BALB/c Schwanzhaut auf den Rücken der rekonstituierten Tiere. Über einen Zeitraum von 100 Tagen wurde das Transplantat-Überleben beobachtet.

*Rag-1* KO Mäuse besitzen aufgrund einer Mutation im *Rag-1* Gen weder B- noch T-Zellen [143]. Dies hat den Vorteil, dass die Abstoßungsreaktion ausschließlich auf das Vorhandensein der injizierten T-Zellen zurückzuführen ist und zudem den transferierten T-Zellen beider Gruppen die gleiche Umgebung bot.

Wie bereits beschrieben, besitzen *Tcain* KI Mäuse weniger spontan gereifte Gedächtnis-T-Zellen als Kontrolltiere (Abschnitt 2.2.3). Um einen vergleichbaren Ausgangspunkt in der Zellaktivierung zwischen den Gruppen zu gewährleisten, wurden sowohl CD4<sup>+</sup> aber auch CD8<sup>+</sup> zu einer naiven T-Zellpopulation vorsortiert (vgl. 5.9). Die sortierten Zellen wurden 1-2 Tage vor der Hauttransplantation in die Schwanzvene injiziert. Die Transplantation von BALB/c Schwanzhaut erfolgte auf den Rücken der rekonstituierten *Rag-1* KO Tiere. Zur Bestimmung des Transplantat-Überlebens wurde Gewicht und Anzeichen von Abstoßung täglich aufgenommen. Abbildung 2-25 zeigt ein Schema des experimentellen Aufbaus. Allogene Transplantate von Mäusen, die mit *Cd4-Cre* T-Zellen rekonstituiert wurden, wurden innerhalb von 21 Tagen nach der Transplantation abgestoßen. Zellen aus *Tcain*-überexprimierenden Mäusen konnten dagegen bis zum Ende des Experiments nach 100 Tagen keine Abstoßungsreaktion auslösen (Abb. 2-26 A). Das Transplantat von Mäusen, die *Cd4-Cre* T-Zellen erhielten, wurde nekrotisch (Abb. 2-26 A: schwarz umrandet, 14 Tage nach Transplantation). Dagegen wuchsen Transplantate von Mäusen, die mit *Tcain* KI<sup>+/+</sup>*Cd4-Cre* T-Zellen rekonstituiert wurden, in das Wundbett ein und zeigten die ursprüngliche Behaarung (Abb. 2-26 A: rot umrandet, 27 Tage nach Transplantation).



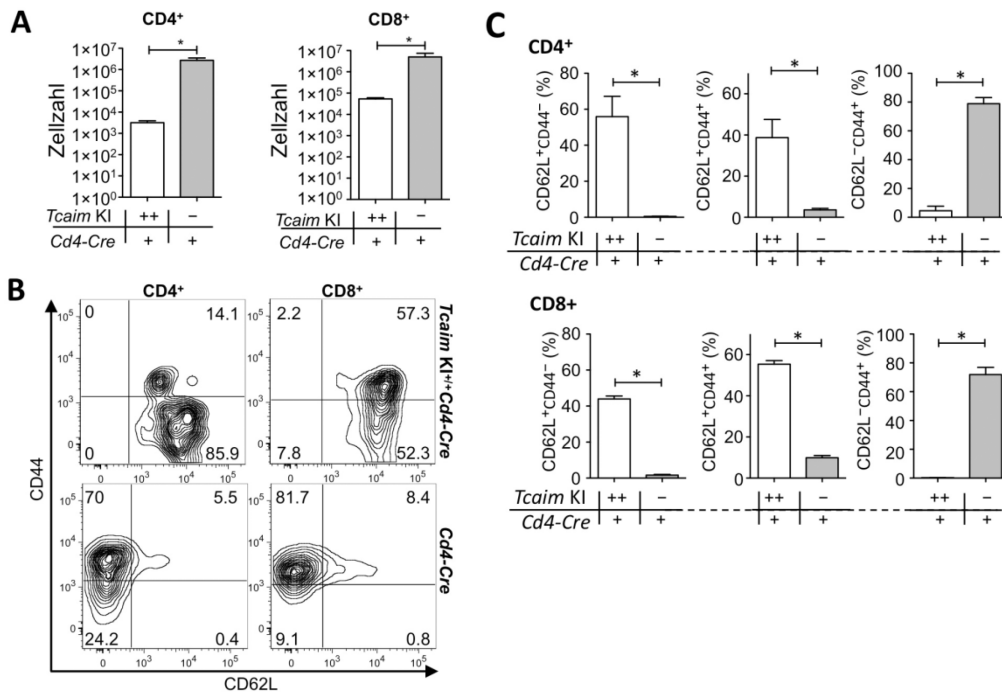
**Abbildung 2- 26. Transplantat-Überleben und Gewichtsverlauf nach allogener Hauttransplantation von rekonstituierten *Rag-1* KO Mäusen.** **A** Das Überleben des Haut-Transplantats von allogener BALB/c Schwanzhaut wurde 100 Tage verfolgt (n = 6-8; Mantel-Cox-Test: \*\*\* $p \leq 0.001$ ). Im Diagramm ist exemplarisch jeweils ein Bild des Transplantats beider Gruppen dargestellt (*Tcain* KI<sup>+/+</sup>*Cd4-Cre*, rot umrandet, Tag 27 und *Cd4-Cre*, schwarz umrandet, Tag 14 rekonstituiert wurden). **B** Gewicht von Tieren die mit T-Zellen aus *Tcain* KI<sup>+/+</sup>*Cd4-Cre* (rot) oder *Cd4-Cre* Mäusen (schwarz) rekonstituiert wurden, bezogen auf das Ausgangsgewicht am Tag 5 nach der Transplantation. Die Graphik zeigt das durchschnittliche Gewicht über einen Zeitraum von jeweils 10 Tagen ( $\pm$  SEM). Eine lineare Regression wurde gerechnet, um die Verbindung zwischen Zeit nach der Transplantation und Körpergewicht zu bewerten (*Tcain* KI<sup>+/+</sup>*Cd4-Cre*: Steigung = 0,15; *Cd4-Cre*: Steigung = -0,48, \*\*\* $p \leq 0,001$ ).

Wie für stark CD45RB-exprimierende T-Zellen beschrieben [144], verursachte der Transfer von *Cd4-Cre* T-Zellen Kolitis, was sich in einer signifikanten Gewichtsabnahme zeigte (Abb. 2-26 B, lineare Regression; Steigung = -0,48). Im Unterschied dazu nahmen Mäuse, die mit *Tcain* KI<sup>+/+</sup>*Cd4-Cre* T-Zellen rekonstituiert wurden, signifikant an Gewicht zu (Abb. 2-26 B, lineare Regression, Steigung = 0,15).

### INFILTRATION UND AKTIVIERUNGSPROFIL DER TRANSFERIERTEN ZELLEN IN DER MILZ

Um die Zellen der rekonstituierten Tiere hinsichtlich des Aktivierungsmusters und ihrer Migration in lymphatische Organe zu vergleichen wurden 21 Tage nach Transplantation Milz und Knochenmark entnommen und in Bezug auf ihre Zellzahl sowie die Expression von CD62L und CD44 untersucht.

Die Ergebnisse für Zellen aus der Milz sind in Abbildung 2-27 dargestellt. 21 Tage nach der Zellinjektion konnten nicht nur *Cd4-Cre* T-Zellen, sondern auch *Tcaim* KI<sup>+/+</sup>*Cd4-Cre* T-Zellen in *Rag-1* KO Mäusen detektiert werden. Jedoch war sowohl die Anzahl der CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> *Tcaim* KI-T-Zellen verglichen mit Kontrollzellen vermindert. Außerdem ließen sich in allen Tieren deutlich mehr CD8<sup>+</sup> als CD4<sup>+</sup> *Tcaim* KI T-Zellen aus der Milz isolieren (Abb. 2-27 A: Anzahl der Zellen als M ± SEM: *Tcaim* KI (CD8<sup>+</sup>):  $5,3 \times 10^4 \pm 0,7$ ; *Cd4-Cre* (CD8<sup>+</sup>):  $5,0 \times 10^6 \pm 2,5$ ;  $p = 0,03$ ; *Tcaim* KI (CD4<sup>+</sup>):  $0,3 \times 10^4 \pm 0,1$ ; *Cd4-Cre* (CD4<sup>+</sup>):  $2,7 \times 10^6 \pm 0,8$ ;  $p = 0,03$ ).



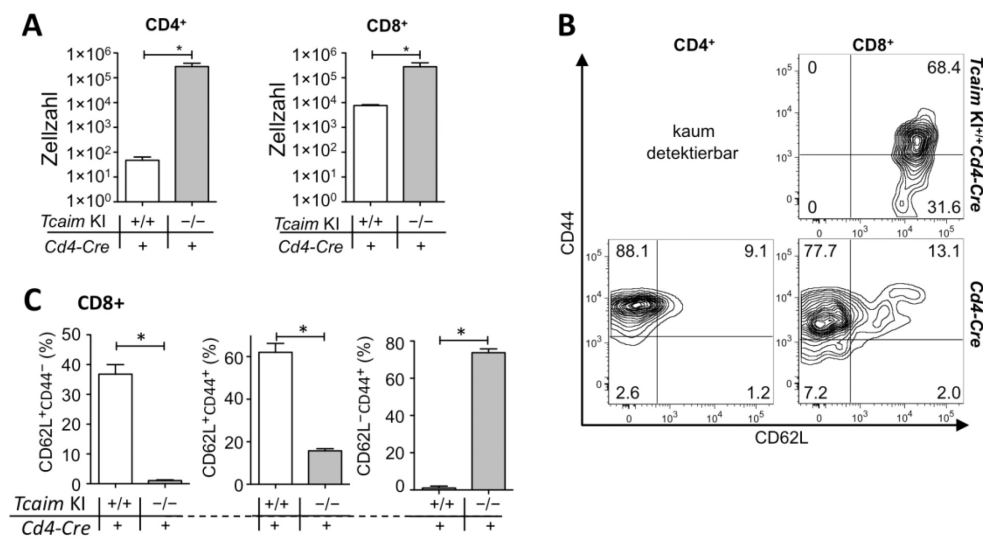
**Abbildung 2- 27. Charakterisierung der *Tcaim* KI<sup>+/+</sup>*Cd4-Cre* bzw. *Cd4-Cre* T-Zellen aus der Milz von *Rag-1* KO Mäusen 21 Tage nach Transplantation. A** Anzahl der detektierten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz 21 Tage nach Transplantation. **B** Repräsentative Darstellung der Aktivierungsmarker CD62L und CD44 auf injizierten *Tcaim*-überexprimierenden CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen und Kontrollzellen. **C** Analyse der injizierten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen beider Gruppen hinsichtlich der Expression von CD62L und CD44. Balken repräsentieren Mittelwerte ± SEM bei einer Stichprobengröße von n = 4. Signifikanz wurde ermittelt durch Mann-Whitney-U-Test: \* $p \leq 0,05$ ).

CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> *Tcaim* KI-T-Zellen unterschieden sich hauptsächlich hinsichtlich der Expression von CD62L von den Kontrollzellen aus *Cd4-Cre* Mäusen. Während Kontrollzellen kaum CD62L auf ihrer Oberfläche trugen, waren *Tcaim* KI Zellen nahezu ausschließlich CD62L<sup>+</sup>. Die CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup> Population war in CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus *Tcaim* KI<sup>+/+</sup>*Cd4-Cre* Mäusen ausgeprägter als in CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus *Tcaim* KI<sup>+/+</sup>*Cd4-Cre* Mäusen (Abb. 2-27 B und C:

CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup> T-Zellen als  $M \pm SEM$ : *Tcaim* KI (CD4<sup>+</sup>): 55,9 %  $\pm$  11,25; *Tcaim* KI (CD8<sup>+</sup>): 44,0 %  $\pm$  1,6).

### KNOCHENMARK INFILTRATION

Mehrfach wurde gezeigt, dass das Knochenmark eine Nische für Gedächtnis-T-Zellen darstellt [145]. Um die Fähigkeit zur Migration ins Knochenmark von *Tcaim* KI-T-Zellen zu untersuchen, wurde die Anzahl der CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Knochenmark der rekonstituierten *Rag-1* KO Tiere bestimmt. Sowohl die Anzahl der CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> *Tcaim* KI T-Zellen war, verglichen mit Kontrollzellen, vermindert (Abb. 2-28 A). Wie in der Milz ließen sich deutlich mehr CD8<sup>+</sup> als CD4<sup>+</sup> *Tcaim* KI T-Zellen im Knochenmark detektieren, wohingegen eine ähnliche Anzahl an CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus *Cd4-Cre* Mäusen detektiert werden konnte (Abb. 2-28 A: Anzahl der Zellen als  $M \pm SEM$ : *Tcaim* KI (CD8<sup>+</sup>):  $0,8 \times 10^4 \pm 0,06$ ; *Cd4-Cre* (CD8<sup>+</sup>):  $2,8 \times 10^5 \pm 1,2$ ;  $p = 0,02$ ; *Tcaim* KI (CD4<sup>+</sup>):  $48 \pm 16$ ; *Cd4-Cre* (CD4<sup>+</sup>):  $2,8 \times 10^5 \pm 1,0$ ;  $p = 0,02$ ). Die Verteilung der CD62L und CD44 Oberflächenexpression zwischen Zellen aus *Tcaim* KI T-Zellen und Kontrollzellen aus dem Knochenmark war ähnlich zur Milz. Während Kontrollzellen kaum CD62L auf ihrer Oberfläche trugen, waren *Tcaim* KI Zellen nahezu ausschließlich CD62L<sup>+</sup> (Abb. 2-28 B und C). Aufgrund der geringen Anzahl detektierbarer CD4<sup>+</sup> *Tcaim* KI-T-Zellen, konnte dies jedoch nur für CD8<sup>+</sup> T-Zellen untersucht werden. In einigen Tieren konnte in CD8<sup>+</sup> *Tcaim* KI T-Zellen, die aus dem Knochenmark isoliert wurden, eine höhere CD44-Expression als bei CD8<sup>+</sup> *Tcaim* KI T-Zellen aus der Milz detektiert werden (Abb. 2-27 C und 2-28 B). Dies schlägt sich auch statistisch nieder (Abb. 2-27 C: % CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> als  $M \pm SEM$ : CD8<sup>+</sup> *Tcaim* KI: 55,3 %  $\pm$  1,8; Abb. 2-28 B: % CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> als  $M \pm SEM$ : CD8<sup>+</sup> *Tcaim* KI: 62,0 %  $\pm$  4,2).



**Abbildung 2- 28. Charakterisierung der *Tcaim* KI<sup>+/+</sup>*Cd4-Cre* bzw. *Cd4-Cre* T-Zellen im Knochenmark von *Rag-1* KO Mäusen 21 Tage nach Transplantation. A** Anzahl der detektierten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Knochenmark. **B** Repräsentative Darstellung der Aktivierungsmarker CD62L und CD44 auf injizierten *Tcaim*-überexprimierenden CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen und Kontrollzellen. **C** Analyse der injizierten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen beider Gruppen hinsichtlich der Expression von CD62L und CD44. Balken repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM bei einer Stichprobengröße von  $n = 4-5$ . Signifikanz wurde ermittelt durch Mann-Whitney-U-Test: \* $p \leq 0,05$ ).

## 2.3 DISKUSSION

### 2.3.1 GENERIERUNG EINER T-ZELLSPEZIFISCHEN *TCAIM* KI MAUS

Naive T-Zellen besitzen ein hohes *Tcaim*-Expressionslevel, das nach deren Aktivierung herunterreguliert wird. Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen welche Effekte TCAIM auf die T-Zellaktivierung hat. Um eine konstant hohe *Tcaim*-Expression in T-Zellen auch während deren Aktivierung zu ermöglichen, wurde eine transgene Mauslinie generiert. Die genetische Veränderung dieser Mauslinie bestand darin, dass der Leserahmen für *Tcaim* zielgerichtet in den *R26* Locus integriert wurde (*Tcaim* KI). Ein dem Leserahmen vorgeschaltetes Polyadenylierungssignal fungierte als Transkriptionsstopp (STOP-Kassette) und verhinderte damit eine vorzeitige Expression. Die STOP-Kassette war von zwei *loxP*-Stellen gleicher Orientierung flankiert und konnte durch eine Cre-vermittelte Rekombination entfernt werden. Über eine IRES konnte eine koordinierte Expression von *Tcaim* und *Egfp* gewährleistet werden. Die Elektroporation eines Cre-exprimierenden Plasmids in die generierten ES-Zellen führte tatsächlich zum Verlust der STOP-Kassette und zu einer Expression von *Tcaim* und *Egfp*. Dies bestätigte, dass die ES-Zellen ein funktionelles und vollständig integriertes 3'-Ende des Zielvektors enthielten.

Die homologe Rekombination am 5'-Ende des transgenen Bereiches wurde in den ES-Zellen durch ein *Screening* mittels Southern Blot bestätigt. Wildtypische und KI-Fragmente unterschieden sich in der Größe (wt: 15,6 kbp; KI: 6,8 kbp). In einigen Klonen, die positiv für das KI-Fragment getestet wurden, konnte ein weiteres Fragment (8,7 kbp) detektiert werden, welches vermutlich aufgrund eines unvollständigen Verdau entstand. Eine EcoRI-Erkennungsstelle im KI-Konstrukt war möglicherweise nicht zugänglich und die Nutzung der nächsten EcoRI-Schnittstelle führte zu einem größeren Fragment (Abb. 2-6). Die theoretisch ermittelte Fragmentlänge stimmte mit der experimentell detektierten überein. Ein unvollständiger Verdau könnte auch die Intensität der Banden im Southern Blot erklären. Erfahrungsgemäß findet die homologe Rekombination meist nur an einem Allel statt, wodurch die Gendosis bzw. Intensität zwischen wildtypischem und mutiertem Allel gleich sein sollte. Bei einem vollständigen Verdau traf diese Vorhersage zu (Abb. 2-7: Klon H3). In Klonen mit einem unvollständigen Verdau hingegen war die Intensität der 6,8 kbp KI-Bande im Vergleich zu wildtypischen Bande um das Maß schwächer um welches die 8,7 kbp-Bande zunahm (Abb. 2-7: Klon A2; D2).

Trotz mehrfacher Injektion der ES-Zellen konnte kein Chimärismus in den Nachkommen erzielt werden bzw. es wurden in den meisten Fällen keine Nachkommen geboren. Dies konnte verschiedene Ursachen haben. Eine naheliegende Erklärung wäre, dass die ES-Zellen ihren pluripotenten Zustand infolge einer inadäquaten Zellkultur verloren hatten und dadurch schon ausdifferenzierten. ES-Zellen, die bereits zu differenzieren beginnen, können nicht mehr zur Bildung eines Embryos beitragen [146]. Um die Funktionalität der ES-Zellen zu testen, wurde daher die Expression typischer Pluripotenzmarker untersucht. Als Positivkontrolle diente eine Stammzelllinie, die bereits zu einer Keimbahn-Transmission beitragen konnte. Alle untersuchten Pluripotenzmarker der generierten ES-Zellklone zeigten eine mit dieser Linie vergleichbar hohe Expression. Eine Differenzierung konnte demnach nicht angenommen werden.

Anschließend sollte eine Chromosomenanalyse mittels FISH den Karyotyp der ES-Zellen untersuchen, da eine ausbleibende Nachkommenschaft und Keimbahntransmission oftmals

auf einen aberanten Karyotyp zurückgeführt werden kann [135]. Das Ergebnis zeigte eine Trisomie 8 in 90-100 % der ausgezählten Metaphasen. Davon waren alle getesteten Klone sowie die Ausgangszellen der ES-Zelllinie betroffen. Diese chromosomale Aberration kann zwar auf zellulärer Ebene toleriert werden [135], ist jedoch schon früh in der Embryonalentwicklung letal [134]. Bei der Untersuchung von 540 häufig verwendeten ES-Zelllinien wiesen nur 66,5 % der Zellen einen normalen, diploiden Karyotyp auf [132]. In Übereinstimmung mit Liu *et al.*, konnte gezeigt werden, dass in 88 der näher untersuchten Stammzelllinien Trisomie 8 mit 33 % die häufigste Aneuploidie war [132, 135]. Darüber hinaus hatten ES-Zellen mit einer Trisomie 8 einen Wachstumsvorteil gegenüber Zellen mit unauffälligem Karyotyp, wodurch es in einer Mischkultur rasch zu einer selektiven Vermehrung der aberranten Zellen kam [135]. Eine ungewöhnliche hohe Wachstumsrate konnte auch bei den getesteten *Tcaim* KI Klonen beobachtet werden. Der hohe Anteil an ES-Zellen mit einer Trisomie 8 erklärte die schwache Injektionsbilanz.

Trotz Trisomie 8 erzielten die Injektionen zweier Klone (A2 und C3) Nachkommen mit hohem Chimärismus. Dies konnte anhand der Fellfarbe detektiert werden, da Blastozysten einer schwarzen C57BL/6 Maus genutzt wurden, die Stammzellen hingegen aus agouti-farbenen Mäusen stammten (V6.5, F1 Generation von C57BL/6 und 129/sv). In diesen Fällen trugen die verbleibenden Zellen mit normalem Karyotyp (7 %) zum Aufbau des Organismus bei. Für diese Injektionen wurde ein alternatives, serumfreies Medium verwendet. Dass dies jedoch einen Selektionsvorteil für ES-Zellen mit normalem Karyotyp darstellte und zur Bildung der Chimären führte, konnte nicht bestätigt werden (Dr. Wörtge, persönliche Kommunikation, 06.2012).

Die chimären Tiere wurden mit C57BL/6 rückgekreuzt. Sollte die Keimbahntransmission mit einer Transgentransmission einhergehen, konnten in der nächsten Generation *Tcaim*-transgene Tiere typisiert werden. Es konnten insgesamt 7 Tiere mit einer *Tcaim*-Transmission typisiert werden. Zwei dieser Tiere (Gründertier 3389 und 16) wurden mit der *Cd4-Cre* Linie verpaart und phänotypisch analysiert. Es konnten keine Unterschiede zwischen den einzelnen Linien beobachtet werden (Daten nicht gezeigt), weshalb die Analysen beider Linien zu einem Datensatz zusammengefasst wurden.

Die Analyse der Gründertiere und deren Nachkommen zeigte eine induzierbare, zellspezifische und Gendosis-abhängige Expression des *Tcaim* KI und *Egfp* in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach der Verpaarung mit *Cd4-Cre* Mäusen.

CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus *Tcaim*-überexprimierenden Mäusen zeigten im Vergleich zu CD4<sup>+</sup> T-Zellen ein leicht vermindertes *Tcaim* mRNA-Level. Eine Ursache könnte die unterschiedliche Reinheit der beiden Populationen sein, denn magnetisch-separierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen konnten in einer Reinheit von 96 % gewonnen werden, wohingegen die Reinheit von CD8<sup>+</sup> T-Zellen nur bei 85 % lag (Daten nicht gezeigt). Eine vergleichbar starke *Egfp*-Expression pro Zelle in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen unterstützt diese Erklärung.

### 2.3.2 PHÄNOTYPISCHE ANALYSE VON ZELLPOPULATIONEN IN DER *TCAIM* KI MAUS

Die Entwicklung von T-Zellen beginnt mit der Einwanderung von Vorläuferzellen in den Thymus. In diesem Stadium sind die Zellen doppeltnegativ (DN) für die Oberflächenmarker CD4 und CD8. Im Cortex durchlaufen DN Zellen verschiedene Stadien, die durch eine differenzielle Expression von CD44 und CD25 beschrieben werden können. Anschließend gehen die T-Zellen in ein CD4CD8-DP Stadium über [137]. Diese Zeit ist für eine *Cre*-



Expression und die nachfolgende Rekombination ausreichend, weshalb auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen als Tochterzellen betroffen sind. In allen folgenden Prozessen könnte sich aufgrund der durch *Cd4-Cre* induzierten *Tcaim*-Expression ein Phänotyp entwickeln.

Es konnten jedoch keine Unterschiede in der Verteilung und der absoluten Zellzahl von CD4CD8-DN, -DP und -einzelpositiven Zellen in *Tcaim* KI Mäusen festgestellt werden. Auch die Größe des Thymus und dessen absolute Zellzahl waren unverändert. Das legt die Vermutung nahe, dass TCAIM auf positive und negative Selektion wenig Einfluss ausübt. Während der positiven Selektion müssen T-Zellen Selbst-Peptid/MHC-Komplexe mit geringer Affinität erkennen und es kommt zur MHC-Restriktion. Zellen, die diese Komplexe nicht erkennen, werden eliminiert. Diese Liganden sind allerdings für reife T-Zellen nicht stimulatив [137], was die Annahme unterstützt, dass ein *Tcaim* KI kaum Auswirkungen auf die positive Selektion hat.

Während der Negativselektion kommt es zur Eliminierung von Zellen, die mit einer zu hohen Affinität binden. Dieser Prozess soll autoreaktive Zellen eliminieren. Ein kleiner Teil dieser Zellen wird jedoch auch in regulatorische T-Zellen konvertiert [18]. Die Annahme, dass diese Liganden stimulierend auf T-Zellen wirken, lässt die Frage zu, ob TCAIM einen Einfluss auf diesen Prozess hat. In den folgenden Teilen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass TCAIM einen negativen Einfluss auf die T-Zellaktivierung hat. Die Auswirkung von TCAIM auf die T-Zellentwicklung im Thymus war nicht Gegenstand dieser Arbeit und wurde deshalb auch nicht detailliert untersucht. Es lässt sich an dieser Stelle nur vermuten, dass ein Einfluss von TCAIM während der Negativselektion möglicherweise mit einer erhöhten Anzahl potenziell autoreaktiver Zellen verbunden sein könnte, die sich später aufgrund einer fehlenden Aktivierbarkeit (aufgrund des *Tcaim* KI) nicht auswirkt. Eine verminderte Umwandlung in regulatorische T-Zellen während der Negativselektion könnte die leicht verminderte Zahl an peripheren regulatorischen T-Zellen erklären. Die Untersuchung der endogenen *Tcaim*-Expression während der Selektionsprozesse könnte hierfür erste Hinweise geben.

Bei der Untersuchung der peripheren T-Zellen konnten nur geringe Unterschiede in der Verteilung und der absoluten Zahl von CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen detektiert werden. Es zeigte sich eine leichte Tendenz zu einer verringerten Anzahl an CD4<sup>+</sup> T-Zellen infolge der *Tcaim*-Überexpression. Entsprechend war die CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulation erhöht. Darüber hinaus konnte eine leicht verringerte Anzahl an CD3<sup>+</sup> Zellen detektiert werden. Diese Variationen erreichten jedoch nur in zwei Fällen Signifikanz. Im folgenden Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass CD8<sup>+</sup> T Zellen aus *Tcaim* KI Mäusen nach einem Transfer in *Rag-1* KO Mäuse stärker homöostatisch proliferieren als CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Dies könnte einen Vorteil für CD8<sup>+</sup> *Tcaim*-überexprimierende T-Zellen gegenüber CD4<sup>+</sup> T-Zellen bedeuten und somit die Verschiebungen in den Zellzahlen erklären (vgl. 2.3.4-2.3.5). Die tendenziell niedrigere Anzahl von CD3<sup>+</sup> Zellen in *Tcaim* KI Tieren im Vergleich zu *Tcaim* KI<sup>+</sup> Kontrolltieren (also ohne die Einkreuzung von *Cd4-Cre*) könnte durch die Expression des Neomycinresistenzgens hervorgerufen werden. Dieses wirkt sich oftmals störend auf die Zellphysiologie aus [147, 148].

### 2.3.3 TCAIM VERÄNDERT MITOCHONDRIALE EIGENSCHAFTEN WÄHREND DER T-ZELLAKTIVIERUNG

Da TCAIM ein mitochondriales Protein ist, das während der T-Zellaktivierung differentiell reguliert wird, übt eine konstant hohe Expression wahrscheinlich Einfluss auf die mitochondrial gesteuerten Prozesse während dieser Phase aus. Prozesse, die hier im Vordergrund stehen umfassen Morphologie und Dynamik der Mitochondrien, Apoptose, mitochondrial-beeinflusste Signaltransduktion und Metabolismus (vgl. 2.1.2). Letzteres wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht, soll jedoch als möglicher Einflussfaktor auf die Signaltransduktion später diskutiert werden.

Die Morphologie von Mitochondrien ist von Zelltyp zu Zelltyp unterschiedlich. Zudem ist in T-Zellen wenig darüber bekannt. Auch sind die Prozesse, die zur Veränderung der mitochondrialen Morphologie führen, noch wenig verstanden. Es konnten jedoch an *Saccharomyces* schon einige zelluläre Faktoren identifiziert werden, die an mitochondrialen Fissions- und Fusionsprozessen beteiligt sind [64]. Zu vielen Faktoren konnten Homologe in Säugern gefunden werden. DRP1 ist ein hochkonserviertes Protein, dass hauptsächlich mit mitochondrialer Fission, also gesteigerter Teilung, in Verbindung gebracht wurde [149, 150].

Auch die *Tcaim*-Expression während der T-Zellaktivierung veränderte die Morphologie von Mitochondrien in CD4<sup>+</sup> T-Zellen. In polyklonal-stimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Kontrolltieren waren die Mitochondrien als kleinere Strukturen konzentriert an einer Stelle der Zellperipherie lokalisiert. Bei *Tcaim* KI-Zellen hingegen traten längliche tubuläre Strukturen auf, die sich nicht an einer Stelle konzentrierten. Diese Beobachtungen sind im Einklang mit Studien an DRP1. Baiauli *et al.* konnten zeigen, dass DRP1 die Positionierung von Mitochondrien nahe des Aktin-reichen Rings der immunologischen Synapse (IS) regulierte. Die Inhibierung von DRP1 führte zu einer verminderten Umverteilung der Mitochondrien und einer gestörten Struktur der IS [83]. Es führte jedoch auch zu einer Verstärkung des TZR-Signals [83]. Dies steht allerdings eher im Widerspruch zu anderen Publikationen sowie den hier gezeigten Daten, die beschreiben, dass eine Rekrutierung von Mitochondrien zur Membran nötig ist, um den Kalziumeinstrom über die Plasmamembran aufrecht zu halten [85, 88]. Hierbei verhinderten Mitochondrien durch die Aufnahme des Kalziums dessen Akkumulation nahe der CRAC-Kanäle und somit deren Kalzium-vermittelte Inaktivierung [85, 88, 96, 151]. Ein verlängertes Kalziumsignal führt damit zur verlängerten nukleären Translokation von NFAT und einer verstärkten T-Zellaktivierung. Neben der Pufferung von Kalzium kann die Signaltransduktion durch die Lokalisation von Mitochondrien an der IS noch auf andere Wege beeinflusst werden.

Beispielsweise bewirkt die T-Zellstimulation eine verstärkte Bildung von TZR-induzierten ROS. Da funktionelle Mitochondrien für diesen Prozess essenziell sind, werden TZR-induzierte ROS höchstwahrscheinlich hauptsächlich durch Mitochondrien gebildet (mROS) [152, 153]. MROS aktivieren viele Proteine der proximalen TZR-Signaltransduktion wie LCK, LAT, ZAP-70, PLC $\gamma$ 1 und SLP76 [106]. Die Autoren vermuteten, dass nach einer Translokation von Mitochondrien zur IS eine lokal erhöhte mROS Konzentration die nachfolgende Signalkaskade und damit die T-Zellaktivierung moduliert. Der Lokalisation von Mitochondrien während der T-Zellstimulation kommt somit eine hohe Bedeutung zu und eine Veränderung bedingt durch TCAIM kann viele nachgeschaltete Prozesse beeinflussen. Da die *Tcaim*-Überexpression mit einer verminderten mROS-Bildung einhergeht (s.u.), unterstützen diese Ergebnisse eher Publikationen, die eine verminderte Signaltransduktion infolge einer fehlenden mitochondrialen Lokalisation beschreiben.

Wie oben angeführt, können Mitochondrien zytosolisches Kalzium aufnehmen und somit als Kalziumpuffer dienen [99]. Es konnte jedoch keine Veränderung der Konzentration des freien zytosolischen Kalziums nach polyklonaler Stimulation von *Tcaim* KI T-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen beobachtet werden. Dies würde eine Beeinträchtigung der kalziumabhängigen Signaltransduktion durch TCAIM ausschließen. Der experimentelle Aufbau läßt in diesem Zusammenhang nur eine Aussage über die Änderung der freien Kalziumkonzentration innerhalb der Zelle und nicht innerhalb von Mitochondrien zu. Zudem ist die Messung mit Indo-1 wenig sensitiv, weshalb nicht abschließend geklärt ist, ob Mitochondrien von *Tcaim* KI-Zellen einen Defekt in der Kalziumaufnahme haben. Intramitochondriale Konzentrationsänderungen von Kalzium lassen sich die Nutzung eines Mitochondrien-spezifischen Kalziumindikators untersuchen. Unterschieden werden fluoreszierende Farbstoffe (wie Rhod-2) von kalziumsensitiven Proteinen (Pericam, Aequorin). Die Nutzung von fluoreszierenden Farbstoffen ist umstritten, da sie weniger sensitiv sind, nicht auf wiederholte Reize reagieren und selbst die mitochondriale Morphologie von einer tubulären zu einer fragmentierten Struktur ändern [154]. Dieser Umstand soll gerade im Hinblick auf die Untersuchung der Funktion von TCAIM verhindert werden. Die Nutzung von kalziumsensitiven Proteinen ist deshalb vorzuziehen [154, 155].

Interessanterweise kann der Fissionsfaktor DRP1 kalziumabhängig durch Calcineurin dephosphoryliert werden. Die Dephosphorylierung von DRP1 führt zu einer erhöhten Assoziation mit Mitochondrien und umgekehrt die Phosphorylierung zu einer erhöhten zytoplasmatischen Lokalisierung. Eine gesteigerte DRP1-vermittelte Fission kann somit direkt mit der Signaltransduktion während der T-Zellaktivierung in Verbindung gebracht werden [156]. Zwar wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss von TCAIM auf die Lokalisation von DRP1 nicht untersucht, jedoch liefert die Datenlage Evidenzen für einen Zusammenhang.

Die T-Zellaktivierung führt, wie oben erwähnt, zu einem Anstieg von mROS und war durch eine konstante *Tcaim*-Expression stark beeinträchtigt. Zum TZR-induzieren Anstieg von mROS können viele unterschiedliche Prozesse beitragen. Beispielsweise korreliert eine erhöhte Metabolismusrate positiv mit einer der ROS Produktion [157]. Auch aktivierte Lymphozyten haben einen allgemein erhöhten Metabolismus, jedoch steigt die Glykolyse im Vergleich zur oxidativen Phosphorylierung um ein Vielfaches an [110]. Obwohl die stärkste Bildung von mROS durch Komplexe der Atmungskette geschieht und daher eher mit dem Prozess der oxidativen Phosphorylierung verbunden wird, kann auch die Glykolyse zu einem starken Anstieg von mROS führen (vgl. 2.1.3). Auch eine gesteigerte mitochondriale Fission wurde mit einer erhöhten mROS Produktion in Verbindung gebracht [89].

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass allogene stimulierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen infolge einer konstanten *Tcaim*-Expression geringere Mengen IL-2 sezernierten, was zu einer verringerten Proliferation führen könnte. Zudem war die Aktivierung dieser Zellen, gemessen anhand der CD44 und CD62L Expression, stark beeinträchtigt. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass eine konstante *Tcaim*-Expression, vermittelt durch eine geringere mROS Produktion, die Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen kontrolliert.

mROS werden eine Feinregulierung der Signaltransduktion nach TZR-Ligation zugeschrieben. Früh konnte gezeigt werden, dass Antioxidanzien die T-Zellproliferation und IL-2 Sekretion inhibierten [102, 103, 158, 159], hingegen die Zugabe subletaler Mengen von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eine T-Zellstimulation bewirkten [160]. Die Zielproteine von mROS sind vielfältig. Neben der selektiven Aktivierung von NFAT durch die Beeinflussung der kalziumabhängigen

Signaltransduktion [105] wurde auch die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und AP-1 beschrieben [104]. Ebenso konnte die Inhibierung von Phosphotyrosinphosphatasen (PTP) durch ROS gezeigt werden [161]. PTP sind Gegenspieler von Proteintyrosinkinasen (PTK), die meist nach einer Rezeptorstimulation die Aktivierung intrazellulär weiterleiten (vgl. TCR-Aktivierung 1.1). Eine globale Inhibierung von PTP würde das zelluläre Gleichgewicht zur Phosphorylierung schieben und Zellaktivierung begünstigen [48]. Der Einfluss von TCAIM, auf die T-Zellaktivierung unterstützt die gegenwärtigen Daten dahingehend, dass Mitochondrien und ihre Lokalisation sich modulierend auf die Stärke der T-Zellaktivierung auswirken können.

Zusätzlich konnte eine verringerte Expression von TH1- und TH17-Zytokinen nach TZR-vermittelter Stimulation in CD4<sup>+</sup> T-Zellen von *Tcaim* KI Mäusen detektiert werden. Zwar gibt es Hinweise darauf, dass die Expression von *Il-17* mROS abhängig ist [162], jedoch deutet eine gleichzeitig verringerte Sekretion von IFN- $\gamma$  eher auf eine globale Beeinträchtigung der TH-Zelldifferenzierung infolge einer *Tcaim*-Überexpression hin.

Die mROS Produktion war bei einer konstanten *Tcaim*-Expression nicht völlig unterbrochen. Dies könnte erklären, weshalb eine verbleibende restliche Zytokinausschüttung genauso wie die geringe Proliferation beobachtet werden konnte.

Ein weiterer wichtiger zellulärer Prozess, bei dem Mitochondrien beteiligt sind, ist die Apoptose. Man unterscheidet den intrinsischen vom extrinsischen Signalweg, wobei erstgenannter durch Mitochondrien ausgelöst wird. Dabei kommt es zur Veränderung der Permeabilität der OMM und infolgedessen zur Diffusion mitochondrialer Proteine ins Zytoplasma. Cytochrom c gilt als einer der Hauptauslöser der sich anschließenden apoptotischen Signalkaskade. Der extrinsische Weg wird ausgelöst durch die Bindung von Liganden an Rezeptoren der TNF-Familie und kann beim Fortschreiten auch den intrinsischen Weg auslösen [138].

Im Rahmen dieser Arbeit konnten keine Anzeichen für einen verstärkten Zelltod von *Tcaim* KI Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen gefunden werden. Die Bestimmung der Anzahl lebender Zellen nach 5-tägiger allogener Kokultur ergab keine Unterschiede zwischen den Gruppen ebenso wie die Untersuchung von Oberflächenphosphatidylserin als Apoptosemarker (vgl. 2.2.4). Im Rahmen der letztgenannten Untersuchung konnten sogar in der Mehrzahl der Experimente eine geringere Anzahl früh- und spät-apoptotischer Zellen in CD4<sup>+</sup> *Tcaim* KI T-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe detektiert werden.

Dies scheint im Widerspruch zu früheren Beobachtungen zu stehen, die zeigten, dass eine *Tcaim*-Überexpression mit einer erhöhten Apoptoserate einherging [61]. Den Daten lagen jedoch zwei sehr unterschiedliche experimentelle Ansätze zu Grunde. Keeren *et al.* nutzten zur Überexpression von *Tcaim* in murinen CD4<sup>+</sup> T-Zellen retrovirale Transduktion. Die genutzten Retroviren gehörten zu den Gammaretroviren, die ihre DNA nur in sich teilende Zellen integrieren [163]. Dies setzte eine Voraktivierung der Zellen voraus, welches die Zellen bereits zum Aktivierungs-induzierten Zelltod (AICD, *activation-induced cell death*) vorbereitet. Nach starkem TZR-Signal und der Abwesenheit von Wachstumsfaktoren wie IL-2 kam es somit zum verstärkten AICD [164]. Im Unterschied hierzu benötigten Zellen von *Tcaim* KI Mäusen keine Voraktivierung, was die unterschiedlichen Resultate hinsichtlich der Apoptose erklären könnte. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die Bildung von TZR-induzierten mROS kritisch für das Auslösen von AICD in T-Zellen ist [153]. Dies könnte erklären, warum in zwei Fällen sogar eine leicht geringere Anzahl an spät-apoptotischen Zellen detektierbar war.

### 2.3.4 EINE KONSTANTE *TCAIM*-EXPRESSION REDUZIERT DIE BILDUNG VON GEDÄCHTNIS T-ZELLEN

Humane Gedächtnis-T-Zellen lassen sich in unterschiedliche Populationen einteilen. Zwei Hauptgruppen werden als zentrale und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen bezeichnet [28]. Diese Populationen unterscheiden sich in Lokalisation, Oberflächenmarker, Proliferationskapazität und Funktionen in der sekundären Antwort (siehe 1.3) [28]. In der Maus ist ebenso eine Unterscheidung dieser Populationen möglich [30–32], jedoch eine unterschiedliche Funktionalität kontrovers diskutiert [37]. Im murinem System dient der Oberflächenmarker CD62L anstelle von CCR7 zur Diskriminierung in zentrale (CCR7<sup>+</sup> und CD62L<sup>+</sup>) und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (CCR7<sup>-</sup> und CD62L<sup>-</sup>). Hingegen können Antigen-erfahrene T-Zellen durch die Expression von CD44 identifiziert werden [38]. Da CD44 während der T-Zellaktivierung schnell hochreguliert wird, kann eine Unterscheidung zwischen Effektor und Gedächtniszellen im Allgemeinen nicht getroffen werden [38].

Innerhalb der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen ging die *Tcaim*-Überexpression mit einer Verschiebung zu naiven (CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>) T-Zellen einher. Dies traf allerdings nicht für die Bestimmung der absoluten Zellzahlen bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus *Tcaim*-überexprimierenden Tieren zu. Eine Erklärung hierfür könnte die tendenziell geringere Anzahl von CD4<sup>+</sup> *Tcaim* KI T-Zellen in *Tcaim*-überexprimierenden im Vergleich zu CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Kontrolltieren sein. Der *Tcaim* KI führte zu einer geringeren Anzahl an spontanen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Während die *Tcaim*-Expression innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Zellen die Bildung von beiden Populationen, nämlich zentrale (CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>) und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (CD62L<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>) beeinträchtigte, war die innerhalb der CD8<sup>+</sup> T-Zellen nur für CD62L<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup> Population zu detektieren.

Die Entstehung von sogenannten *memory phenotype* (MP) T-Zellen in naiven Tieren ist weitgehend ungeklärt. MP-T-Zellen sind charakterisiert durch eine hohe CD44-Expression und ähneln daher Antigen-spezifischen Gedächtnis-T-Zellen. Man nimmt an, dass Interaktionen mit Selbstantigenen und der mikrobiellen Darmflora eine Rolle spielen [27]. Die hier beschriebenen spontanen zentralen und Effektor- Gedächtnis-T-Zellen können den sogenannten MP-T-Zellen zugeordnet werden. Obwohl es auch Unterschiede zwischen MP- und Antigen-spezifischen Gedächtnis-T-Zellen gibt, teilen beide auch viele Gemeinsamkeiten [27, 165]. Insbesondere CD8<sup>+</sup> MP T-Zellen sind den Antigen-spezifischen Gedächtnis-T-Zellen sehr ähnlich [166]. Vor diesem Hintergrund kann aus der verringerten Anzahl CD44<sup>+</sup> T-Zellen in *Tcaim* KI Mäusen auf einen Einfluss von TCAIM auf die Gedächtnis-T-Zellentstehung geschlossen werden. Weitere Experimente sind jedoch nötig um den Einfluss von TCAIM auf Antigen-spezifische Gedächtnis-T-Zellen und die deren Subpopulationen genauer zu untersuchen.

### 2.3.5 EINE KONSTANTE *TCAIM*-EXPRESSION IN T-ZELLEN VERHINDERT DIE ABSTOßUNG VON ALLOGENEN HAUTTRANSPLANTATEN

Der Einfluss von TCAIM auf die Differenzierung in Effektor-T-Zellen wurde auch *in vivo* untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass *Tcaim* KI T-Zellen nach dem Transfer in *Rag-1* KO Mäuse keine Abstoßung des allogenen Hauttransplantats auslösen können. Dieser, verglichen mit den *in vitro* Ergebnissen, sehr starke Phänotyp, wird wahrscheinlich durch das Zusammenspiel mehrerer Effekte verursacht.

Beispielsweise könnte eine verminderte Zytokinproduktion und allogen-induzierte Proliferation, wie sie auch *in vitro* beobachtet wurde, eine mögliche Ursache sein.

Darüber hinaus könnte die veränderte Expression von *homing*-Rezeptoren einen großen Beitrag liefern. Eine konstante *Tcaim*-Expression verhinderte die Herunterregulation von CD62L. Kürzlich konnten zwei Publikationen einen Zusammenhang zwischen der Expression von CD62L und mROS Produktion zeigen. Eine verstärkte mROS Produktion führte zum *Shedding* von CD62L auf der Zelloberfläche durch die Aktivierung von redoxsensitiven Metalloproteinasen wie ADAM17 (*a desintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 17*) [167, 168]. Die hohe CD62L-Expression in *Tcaim* KI T-Zellen *in vivo* und *in vitro*, könnte somit auf die verringerte TZR-vermittelte mROS Produktion zurückgeführt werden.

Ebenso könnte die verminderte Expression von CD44 in *Tcaim* KI T-Zellen zu einem veränderten Migrationsverhalten beitragen. CD44 kann Einfluss auf verschiedenste Prozesse nehmen, beispielsweise dient es während einer Entzündung als Adhäsionsprotein und trägt zur Auswanderung von T-Zellen in entzündetes Gewebe bei [169]. Dies könnte eine Erklärung für eine verminderte Infiltration in das Transplantat geben und damit zur Tolerierung des Transplantats beigetragen haben. Auch die Untersuchung der Expression von Haut-spezifischen *homing*-Rezeptoren in diesen Zellen wie P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 und Chemokin Rezeptor Typ 4 wäre in diesem Zusammenhang interessant und könnte Aufschluss darüber geben [170, 171].

21 Tage nach der Injektion der Zellen konnten *Cd4-Cre* T-Zellen, aber auch *Tcaim*-überexprimierende T-Zellen aus *Rag-1* KO Tieren isoliert werden. Dies unterstützt die *in vitro* Untersuchungen zur Apoptose, die keinen verstärkten Zelltod infolge einer *Tcaim*-Überexpression aufzeigen konnten. Allerdings war die Anzahl an *Tcaim* KI T-Zellen, die aus dem Knochenmark und der Milz isoliert wurden, im Vergleich zu Kontrollzellen stark vermindert. Auch zeigte sich, dass in beiden Fällen CD4<sup>+</sup> Zellen von *Tcaim* KI Mäusen stärker in der absolute Zellzahl betroffen waren als CD8<sup>+</sup> Zellen. Die verminderte CD44-Expression von *Tcaim*-überexprimierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu CD8<sup>+</sup> T-Zellen könnte eine Erklärung für die verminderte Rekrutierung ins Knochenmark geben, wofür die Expression von CD44 notwendig scheint [172]. Da CD4<sup>+</sup> *Tcaim* T-Zellen aber noch fähig waren CD44 zu exprimieren, kann dies nicht der einzige Grund für den großen Unterschied in der Zellzahl sein.

Die in der Milz detektierte absolute Zellzahl der Kontrollgruppe überstieg um ein Vielfaches die Anzahl der injizierten Zellen. Die Proliferation war wahrscheinlich gemischten Ursprungs, das heißt Alloantigen-induziert aber auch homöostatisch. Der Transfer von naiven T-Zellen in lymphopenische Wirte wie *Rag-1* KO Mäuse resultiert in einer massiven homöostatischen Proliferation der Zellen, auch als Lymphopenie-induzierte-Proliferation (LIP)<sup>5</sup> bezeichnet [173, 174]. Man nimmt an, dass die Zellen die freie Nische detektieren und eine massive Produktion von IL-7, die Proliferation verursacht [27]. Wie bereits eingeführt, lassen sich in naiven Tieren CD44<sup>+</sup> T-Zellen detektieren, die man als MP-T-Zellen bezeichnet. Auch der Transfer von naiven Zellen in lymphopenische Wirte führt zu einer Konvertierung zu MP-T-Zellen [27]. LIP naiver Zellen ist dominanter in CD8<sup>+</sup> als in CD4<sup>+</sup> T-Zellen [175], was die Unterschiede zwischen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> *Tcaim* KI T-Zellen erklären könnte. Ein

<sup>5</sup> LIP geschieht nicht in Abwesenheit von MHC, ein Zeichen dafür, dass Selbstantigene bei diesem Prozess eine große Rolle spielen [27].

Unterschied in der Proliferationsrate zwischen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen der Kontrollgruppe konnte jedoch nicht beobachtet werden. Aufgrund der niedrigen Zellzahlen von *Tcaim* KI T-Zellen in der Milz ist anzunehmen, dass die Zellen nur in sehr geringem Umfang proliferierten und diese Proliferation war innerhalb von *Tcaim* KI T-Zellen bei CD8<sup>+</sup> stärker als bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Es ist anzunehmen, dass die *Tcaim*-Expression sowohl die Antigen-induzierte als auch die homöostatische Proliferation (beeinflusst durch LIP) beeinträchtigte.

Eine mögliche Erklärung für die beobachteten Unterschiede zwischen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen könnte eine unterschiedliche Abhängigkeit von *common*  $\gamma$ -chain Zytokinen ( $\gamma_c$ ) (wie IL-2, IL-7 und IL-15) sein. TCAIM inhibierte die IL-2 Sekretion in CD4<sup>+</sup> T-Zellen. IL-2 ist für CD4<sup>+</sup> T-Zellen sowohl Wachstums- als auch Überlebenssignal, während es für CD8<sup>+</sup> T-Zellen nicht in der Aktivierung sondern erst in der Restimulation notwendig scheint [27]. Auch IL-7-vermittelte Effekte können einen Einfluss auf die unterschiedliche Proliferation von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen haben. So konnte gezeigt werden, dass IL-7 zur Herunterregulation von MHCII in CD127<sup>+</sup> (IL-7-Rezeptor  $\alpha$ -Kette) DCs führt, was einer massiven Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei Lymphopenie entgegen wirkt [165, 176]. Darüber hinaus scheint IL-15 für CD8<sup>+</sup> T-Zellen bedeutender zu sein als für CD4<sup>+</sup>. Während im naiven Zustand CD8<sup>+</sup> T-Zellen nur auf IL-7 reagieren, wirkt nach deren Konvertierung zu MP-Zellen auch IL-15. Für zentrale Gedächtnis-T-Zellen sind Signale vermittelt durch IL-7 und IL-15 unerlässlich [165]. Wobei die Abhängigkeit von IL-15 für CD4<sup>+</sup> T-Zellen weniger stark ist als für CD8<sup>+</sup> T-Zellen [177]. Als Ursache hierfür wurde eine geringere Expression von CD122 auf aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen beschrieben [178].

Die unterschiedliche Abhängigkeit von  $\gamma_c$ -Zytokinen könnte zur verringerten Proliferation von *Tcaim* KI T-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen beitragen, aber auch die beobachteten Unterschiede zwischen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> *Tcaim* KI T-Zellen erklären. Ebenso könnte es die Unterschiede im Aktivierungsprofil von CD4<sup>+</sup> im Vergleich zu CD8<sup>+</sup> *Tcaim* KI T-Zellen erklären. TCAIM scheint sich nur in CD4<sup>+</sup> *Tcaim* KI T-Zellen nicht aber in CD8<sup>+</sup> auf die Bildung zentrale Gedächtnis-T-Zellen (CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>) auszuwirken. Dies zeigte sowohl die Analyse von spontanen Gedächtnis-T-Zellen sowie die der in *Rag-1* KO Mäuse transferierten Zellen. Es wäre deshalb interessant zu untersuchen, ob CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> *Tcaim* KI T-Zellen sich in der Expression von IL-7- und IL-15-spezifischer Rezeptoren und der Reaktion auf beide Zytokine unterscheiden.

### 2.3.6 GEGENWÄRTIGES MODELL UND AUSBLICK

Die in dieser Arbeit beschriebenen Daten lassen sich zu folgendem Modell zusammenfassen. Die TZR-Stimulation führt in wildtypischen Zellen zu einer gesteigerten Fission der Mitochondrien, welche somit effektiver zu aktiven, fokalen Membranbereichen rekrutiert werden können. Hier trägt die TZR- und Fissions-induzierte Bildung von mROS zur Aktivierung redoxsensitiver Moleküle bei, welche die Signaltransduktion und damit T-Zellaktivierung verstärken. Die konstante Expression von *Tcaim* dagegen verhindert sowohl die Fission und Umverteilung als auch die Bildung von mROS, was sich negativ auf die Signaltransduktion auswirkt. Als Folge kommt es zu einer verringerten Expression von IL-2 und Effektorzytokinen.

Eine konstante *Tcaim*-Expression führt zu einem naiven Phänotyp. So bleibt auch nach Aktivierung CD62L auf der Zelloberfläche erhalten. In wildtypischen Zellen hingegen kommt

es (möglicherweise unterstützt durch mROS) zu einer Herunterregulation bzw. *shedding* des Rezeptors.

Die Expression des Adhäsionsproteins und Gedächtnis-T-Zellmarkers CD44 hingegen ist bei einer konstanten *Tcaim*-Expression negativ beeinträchtigt. Infolge der Einschränkung von Effektorfunktionen und der veränderten Expression von *homing*-Rezeptoren können T-Zellen mit einer konstant hohen *Tcaim*-Expression nicht die Abstoßung allogener Transplantaten vermitteln (zusammengefasst in Abb. 2-29).

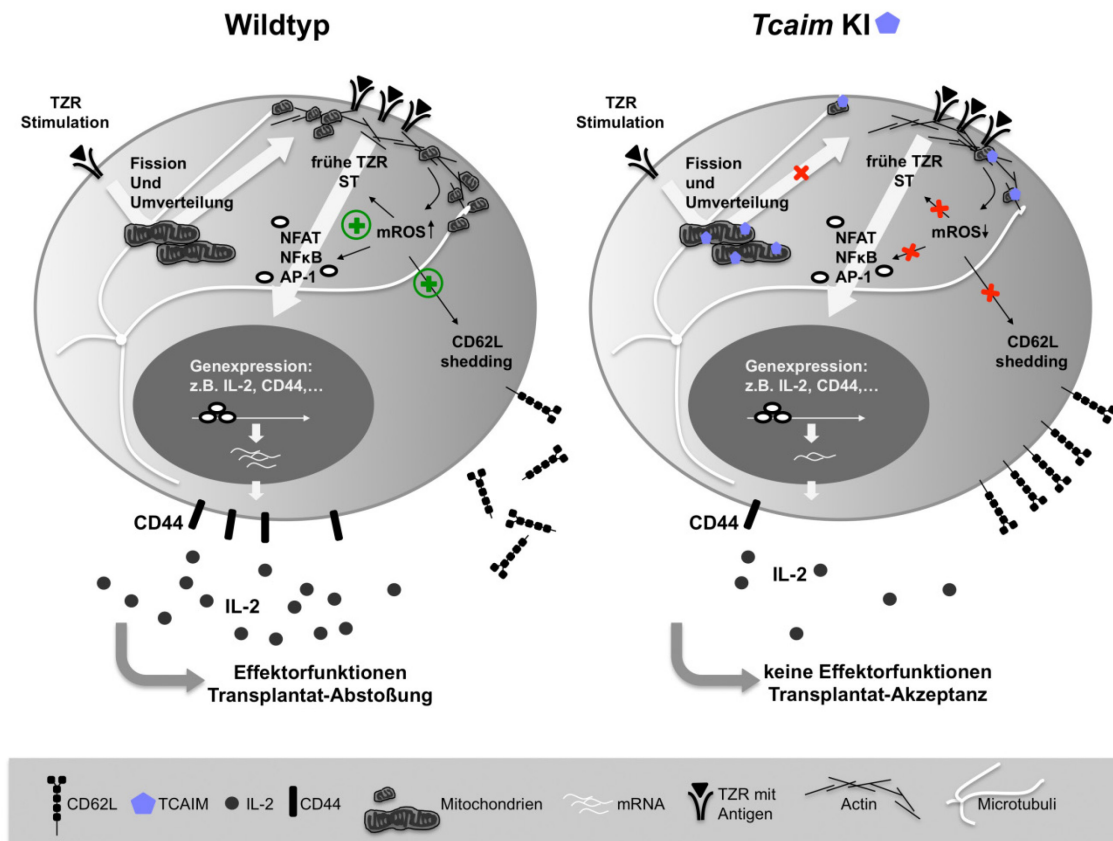


Abbildung 2- 29. Modell zur Wirkungsweise einer konstanten *Tcaim*-Expression während der Stimulation von T-Zellen im Vergleich zum Wildtyp.

Über die exakte Funktion oder Wirkungsweise (z.B. über Protein-Protein-Wechselwirkungen) von TCAIM kann zu diesem Zeitpunkt nur spekuliert werden. TCAIM besitzt neben einer mitochondrialen Lokalisierungssequenz eine J-Domäne am C-Terminus. Diese Domäne vermittelt in Ko-Chaperonen die Bindung an Chaperone und beschleunigt deren ATPase-Aktivität. Aber die J-Domäne wurde auch in nicht-verwandten Proteinen gefunden und ist dort unter anderem in Prozesse involviert, die den mitochondrialen Proteintransport und die Kinaseaktivität regulieren [179]. Kürzlich konnte eine weitere Studie zeigen, dass ein mitochondriales Protein mit einer J-Domäne an den Komplex I der Atmungskette bindet und diesen in der Aktivität moduliert [180]. Weitere Untersuchungen sind nötig, um einen größeren Einblick in die Wirkungsweise von TCAIM zu gewinnen.

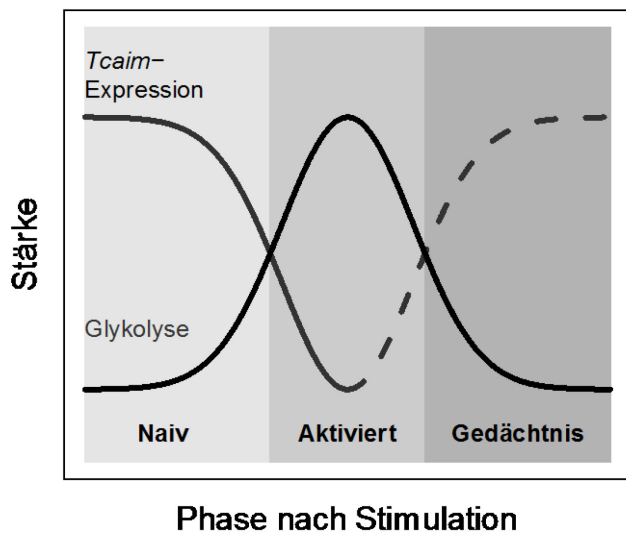


Ungeklärt ist ebenso, wie eine *Tcaim*-Expression die Fission von Mitochondrien beeinflussen kann. Beispielsweise könnte die Rekrutierung des Fissionsfaktors DRP1 an die Mitochondrien beeinflusst werden. Eine direkte Wechselwirkung könnte sich darin zeigen, dass DRP1 trotz Calcineurin-abhängiger Dephosphorylierung nicht an die Mitochondrien binden kann. Ist aber die Hemmung der mitochondrialen Fission eher zurückzuführen auf eine allgemein eingeschränkte Aktivierung der Zelle, könnte man eine verminderte Rekrutierung zu Mitochondrien infolge einer geringeren Dephosphorylierung erwarten. Da die Prozesse zur mitochondrialen Dynamik (Fission und Fusion) noch wenig verstanden sind, ist auch eine mögliche Rolle von TCAIM schwer einzuordnen.

Eine weitere offene Frage ist, welche Zielproteine in der Signalkaskade durch eine konstante *Tcaim*-Expression betroffen sein könnten. Die Tatsache, dass sehr viele redoxsensitive Proteine in der TZR-vermittelten Signalkaskade (sowohl proximale als auch distale Faktoren) beschrieben wurden, führt zur Annahme, dass sich eine verringerte mROS Produktion eher global auswirkt [gezeigt für proximale Faktoren in 106]. Dennoch zeigen einige Publikationen eine sehr spezifische Auswirkung auf Transkriptionsfaktoren [105, 153]. In diesem Zusammenhang wäre es auch wichtig eine mögliche Beeinträchtigung der Kalziumaufnahme in Mitochondrien zu untersuchen. Zwar konnte bisher kein Einfluss von TCAIM auf den zellulären Kalziumeinstrom gezeigt werden, das schließt jedoch nicht eine gestörte Aufnahme in Mitochondrien aus. Kalzium führt in Mitochondrien zu einer verstärkten ATP-Bildung durch die Aktivierung der Enzyme des Citratzyklus [97, 98]. Dies wiederum könnte eine Rolle in der Bereitstellung von ATP an der immunologischen Synapse spielen.

Aktivierete T-Zellen nutzen in sehr großem Umfang die Glykolyse zur Energiegewinnung, naive und ruhende T-Zellen dagegen die oxidative Phosphorylierung und Fettsäureoxidation [45, 110]. Der Übergang von oxidativer Phosphorylierung zur Glykolyse als Form der Energiegewinnung nennt man *metabolic switch*. Dieser Aspekt wird interessant durch den Vergleich zwischen der Expression von endogenem *Tcaim* und der Stärke der Glykolyse zu den unterschiedlichen Zeitpunkten der T-Zellstimulation. Denn die *Tcaim*-Expression korreliert negativ mit der Stärke der Glykolyse (Abb. 2-30). Diese Arbeit zeigte bereits die verringerte *Tcaim*-Expression nach der T-Zellaktivierung, in humanen Gedächtnis-T-Zellen konnte wiederum ein Anstieg im Vergleich zu aktivierten T-Zellen gezeigt werden (B. Sawitzki, persönliche Kommunikation, 18.11.2013).

Der *metabolic switch* konnte mit einem Anstieg von mROS in Verbindung gebracht werden [82]. Die Aktivierung von unterschiedlichen Stoffwechselwegen kann somit die Differenzierung von unterschiedlichen T-Zellsubpopulationen beeinflussen. Beispielsweise sind CD8<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen und regulatorische T-Zellen stark vom mitochondrialen Fettsäurestoffwechsel abhängig [46, 108, 181]. In diesem Zusammenhang wäre es deshalb interessant zu untersuchen, ob und wie TCAIM Einfluss auf Stoffwechselwege nehmen kann.



**Abbildung 2- 30. Negative Korrelation zwischen Tcaim-Expression und Glykolyse in naiven, aktivierten und Gedächtnis-T-Zellen.** T-Zellen nutzen während der T-Zellaktivierung die Glykolyse als Form der Energiegewinnung, nicht aber im ruhenden Zustand (naiv und Gedächtnis-T-Zellen). Die Tcaim-Expression verhält sich der Stärke der Glykolyse entgegengesetzt (vgl. Abb. 1-6). Humane Gedächtnis-T-Zellen zeigen wiederum eine erhöhte Tcaim-Expression, was möglicherweise auch für murine T-Zellen zutreffen könnte (unterbrochene Linie; Prof. Sawitzki, persönliche Kommunikation, 18.11.2013).

Krankheiten mitochondrialen Ursprungs sind in den meisten Fällen multisystemisch, weshalb die direkte Beeinflussung des Immunsystems oft nur schwer zu bestimmen ist [7, 182]. Es ist nur wenig bekannt über die immunologischen Aspekte bei mitochondrialen Krankheiten. Eine Fallstudie, zeigte die Auswirkungen einer Defizienz mehrerer Komplexe der Atmungskette auf das Immunsystem des Patienten [51]. Der Patient zeigte schon früh nach der Geburt Infektionen von *Staphylococcus aureus* und *Klebsiella pneumoniae*. Bei der Untersuchung von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigte sich eine verminderte Aktivierung beider Zellpopulationen auf eine IL-2 Stimulation (gemessen an CD69 und HLA-DR-Expression). Darüber hinaus hatten CD8<sup>+</sup> T-Zellen einen Defekt in der Expression von CD45RO nach PMA/Ionomycin-vermittelter Stimulation. Zwei weitere Studien berichteten, eine erhöhte Anfälligkeit für virale Infektionen infolge einer Komplex I-Defizienz. Interessanterweise waren in beiden Studien Faktoren betroffen, die beim Aufbau von Komplex I beteiligt sind [7, 52, 53]. Die Befunde dieser Studien zeigen ein mit den Resultaten dieser Arbeit vergleichbares immunologisches Bild und unterstreichen damit die Bedeutung mitochondrialer Proteine für Immunantworten.

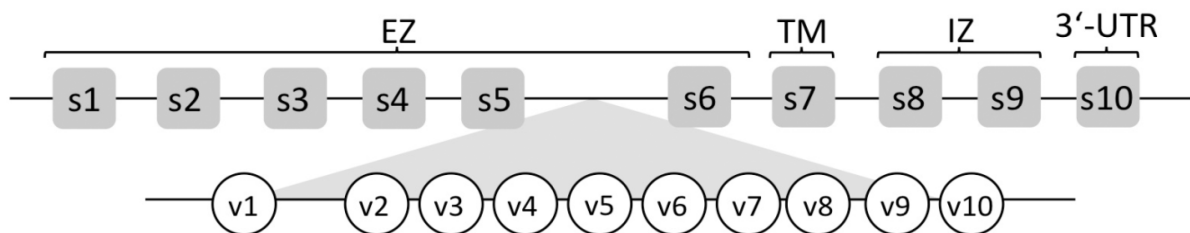
Diese Arbeit zeigt zum ersten Mal, dass das mitochondriale Protein TCAIM sowohl die T-Zellaktivierung als auch deren Differenzierung zu Effektorzellen negativ reguliert, indem es die TZR-vermittelte Verteilung von Mitochondrien und mROS Produktion stört. Dies erklärt zudem, warum die Tcaim-Expression schnell nach T-Zellaktivierung und vor Abstoßung allogener Transplantate herunterreguliert wurde [54, 183]. Angesichts der zentralen Rolle von Mitochondrien während der T-Zellaktivierung und der Rolle mitochondrialer Proteine bei Krankheiten könnten diese Ergebnisse auch Einfluss auf Immunregulation und die Therapie von Entzündungsprozessen haben. Sie zeigen, dass Pharmazeutika, die in den mitochondrialen Metabolismus eingreifen auch die T-Zellaktivierung, die Bildung von Gedächtnis-T-Zellen und damit den gesamten Entzündungsprozess beeinflussen können.

### 3 EXTRAZELLULÄRE SIGNALE WÄHREND DER T-ZELLAKTIVIERUNG UND -DIFFERENZIERUNG

#### 3.1 EINLEITUNG

##### 3.1.1 CD44-PROTEINSTRUKTUR UND -EXPRESSION

Das Protein CD44 wird durch ein Gen kodiert, kommt aber bedingt durch alternatives Spleißen und eine starke posttranslationale Modifikation in einer sehr großen strukturellen Diversität vor. Die sogenannte CD44-Standardform (als CD44s oder auch CD44H bezeichnet; H: hämatopoetisch) wird durch 10 Exons kodiert und besitzt nach posttranslationaler Modifikation eine Größe von 80-100 kDa. Daneben existieren noch diverse variable CD44 Formen, die ein oder mehrere der 10 variablen Exons enthalten und ein Molekulargewicht von bis zu 250 kDa haben können [184, 185]. Die genetische Organisation und Lokalisation unterschiedlicher Proteinbereiche ist in Abbildung 3-1 dargestellt.



**Abbildung 3- 1. Proteinstruktur von CD44** [Abbildung adaptiert nach 186]. Die Exons der Standardform sind mit s1-s10 beschriftet. Extrazelluläre (EZ), Transmembran- (TM) und intrazelluläre Bereiche (IZ) des späteren Proteins sind gekennzeichnet. Das Exon s10 kodiert für den untranslatierten 3' Bereich der mRNA (3'-UTR). Alternative Exons sind durch v1-v10 gekennzeichnet.

CD44 ist ein Transmembranprotein der Klasse I, das heißt der Aminoterminus befindet sich im extrazellulären Bereich. Es kann aber ebenso extrazellulär als lösliches Protein vorliegen. Der häufigste Mechanismus, der zur CD44-Freisetzung führt, geschieht durch Prozessierung an der Zellmembran [187]. Es kann aber auch eine lösliche Variante exprimiert und sezerniert werden [188]. Diese Arbeit wird sich ausschließlich mit CD44 als Transmembranprotein beschäftigen. Der intrazelluläre Carboxyterminus besitzt keine intrinsische enzymatische Aktivität, kann aber verschiedenste Proteine binden und dadurch Signalkaskaden beeinflussen (vgl. 3.1.3). Im aminoterminalen Bereich liegt die Bindestelle für Hyaluronsäure, welches einer der wichtigsten Liganden von CD44 ist. Die Bindestelle überlappt nicht mit den variablen Exons [189] und ist deshalb auf allen CD44 Isoformen erhalten. Allerdings ist die Affinität von posttranslationaler Modifikation, Expressionsstärke, *Clustering* und Splicevarianten abhängig und kann daher stark zwischen verschiedenen Zellen variieren [185, 186]. T-Zellen exprimieren die CD44-Standardform, aber auch eine das variable Exon 5 einschließende Form, wurde beschrieben [184].

##### 3.1.2 CD44-LIGANDEN

CD44 bindet an diverse Liganden, wie beispielsweise Hyaluronsäure [190], Kollagen [191], Fibronectin [192] und Osteopontin (OPN) [193].

Hyaluronsäure (HA: *hyaluronic acid*), der wichtigste Ligand für CD44, ist ein lineares Polymer aus sich wiederholenden Einheiten von D-Glucuronsäure (1- $\beta$ -3) und N-Acetyl-D-Glukosamin (1- $\beta$ -4) und gehört zur Gruppe der Glucosaminoglycane. Es kann bis zu 10.000 kDa schwer werden und ist ein natürlicher Bestandteil der extrazellulären Matrix (EZM). Dort dient es neben der Hydratisierung des Gewebes und Bindung von makromolekularen Bestandteilen auch als Ligand von zellulären Oberflächenrezeptoren [194]. Hyaluronsäure kommt in unterschiedlichen Fragmentgrößen vor. Die größten Fragmente werden als hochmolekulares HA (HMWHA: *high molecular weight HA*) bezeichnet und sind größer als 1.000 kDa. Der Begriff niedermolekulares HA (LMWHA: *low molecular weight HA*) hingegen umfasst eher kleine Fragmente von einem Molekulargewicht bis zu 200 kDa. Die Degradation von Hyaluronsäure mit hohem Molekulargewicht zu solchem mit niedrigem Molekulargewicht geschieht vor allem an Entzündungsherden und geht mit der Veränderung ihrer biologischen Aktivität einher [zusammengefasst in 195]. LMWHA ist dabei ein endogener Stimulus für dendritische Zellen sowie Makrophagen und wird deshalb auch oft als DAMP (*damage associated molecular pattern*) bezeichnet [196]. Die Signaltransduktion in diesen Zellen wird jedoch nicht über CD44 sondern TLR4 (*toll-like receptor 4*) und TLR2 vermittelt [197, 198]. Die Fragmentierung von HMWHA kann enzymatisch (durch Hyaluronidasen) aber auch durch Depolymerisierung (vermittelt durch ROS) geschehen [194, 199].

Neben CD44 existieren weitere HA-Rezeptoren, wie beispielsweise LYVE1 (*lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1*), RHAMM (*receptor of HA-mediated motility*) und TSG-6 (*TNF-stimulated gene 6*) [zusammengefasst in 194, 200].

### 3.1.3 CD44 UND DESSEN FUNKTIONEN IN T-ZELLEN

CD44 wird von naiven T-Zellen nur schwach exprimiert, jedoch früh nach TZR-Stimulation hochreguliert. Eine starke CD44-Oberflächenexpression bleibt auch nach dem Abklingen der Immunreaktion erhalten [38]. Da eine hohe CD44-Expression den Antigenkontakt der Zelle anzeigen kann, dient es als Marker für eine T-Zellaktivierung und Gedächtnis-T-Zellen. Neben der Nutzung als Aktivierungsmarker, werden CD44 zahlreiche Funktionen während der T-Zellaktivierung zugeschrieben. Dazu zählen Prozesse wie Migration, Wachstum, Überleben und Zellaktivierung. Alle Funktionen können auf drei Eigenschaften des Proteins zurückgeführt werden [gemäß 184]:

- CD44 ist ein Adhäsionsmolekül und interagiert mit der EZM.
- Es fungiert als Korezeptor und nimmt somit Einfluss auf die Zellaktivierung.
- Es interagiert mit dem Aktinskelett.

#### DIE ROLLE VON CD44 ALS ADHÄSIONSMOLEKÜL

Für diese Arbeit ist vor allem die Funktion als Korezeptor, sowie als Adhäsionsprotein wichtig. Die Rekrutierung von Lymphozyten zu Infektionsherden ist einer der ersten und wichtigsten Schritte in der Abwehr von Erregern. Leukozyten werden durch Chemokine angelockt und bewegen sich außerhalb der Blutbahnen durch Zelladhäsionsproteine entlang der EZM. Um die Blutbahnen zu verlassen, docken die Leukozyten am Endothel an und es kommt über mehrere Schritte zur Auswanderung. CD44 ist dabei für den ersten Prozess des „Rollens“ am Endothel wichtig [169, 201], wobei HA als Brücke zwischen zwei CD44

exprimierenden Zellen dienen kann [zusammengefasst in 202]. Es ist aber auch für einige Leukozyten eine Interaktion zwischen CD44 und E-Selektin beschrieben [203]. Ausgewanderte Leukozyten interagieren über CD44 mit löslichen Komponenten der EZM, hierbei spielt nicht nur Hyaluronsäure sondern auch andere Komponenten eine Rolle. Beispielsweise wurde für Tumorzellen beschrieben, dass CD44 an Matrixmetalloproteinase-9 (MMP-9) binden kann und damit am Umformen der EZM beteiligt ist [204]. Auch konnte gezeigt werden, dass TGF- $\beta$  durch die MMP-9 in seine aktive Form gespalten werden kann, wodurch beispielsweise Tumorzellen einer Immunüberwachung entgehen können [205].

### CD44 ALS KOREZEPTOR

Eine große Anzahl an Publikationen schreibt CD44 eine Funktion als Korezeptor zu [zusammengefasst in 184]. Für Leukozyten wurde mehrfach eine Assoziation von CD44 mit der Tyrosinkinase LCK beschrieben [206–208]. Die Phosphorylierung von ZAP-70 durch LCK ist eines der ersten Ereignisse nach der TZR-Stimulation. Ebenso wie eine TZR-Stimulation soll auch die Vernetzung von CD44 zur Aktivierung von LCK und ZAP-70 führen [206]. Eine Vernetzung durch Hyaluronsäure vor der TZR-Stimulation ist allerdings nicht sehr effektiv, denn erst eine TZR-vermittelte Stimulation induziert „aktives“ CD44, das HA bindet [209]. Zwar kann HA auch dendritische Zellen aktivieren, jedoch spielt die CD44-Expression seitens der T-Zelle die entscheidende Rolle für deren Proliferation [210].

Ein geringer Anteil an CD44-Molekülen ist in Glykolipid-reichen Membranbereichen, auch *Lipid rafts* genannt, lokalisiert. Nur dieser Anteil assoziiert mit LCK, weshalb die Autoren davon ausgehen, dass die Bindung von LCK und CD44 durch Glykolipid-reiche Membranbereiche stabilisiert oder vermittelt werden könnte [207]. Eine weitere Studie zeigte, dass ein Großteil von LCK Zink-abhängig und direkt an CD44 bindet [211].

Eine signalverstärkende und damit kostimulatorische Wirkung durch CD44 wird durch Arbeiten von Föger *et al.* unterstützt. CD44 konnte, ähnlich wie CD28, zur Kostimulation von T-Zellen beitragen. Besonders bei geringer  $\alpha$ CD3-Konzentration verstärkte die Vernetzung von CD44 die Proliferation, die Phosphorylierung von Erk und in geringerem Maße auch von c-Jun [208]. Eine Aktivierung durch die CD44-Vernetzung war in allen Fällen nur in Kombination mit  $\alpha$ CD3-vermittelter Stimulation zu beobachten. Zu dem molekularen Mechanismus, der zur Verstärkung des TZR-Signals führt, formulierten die Autoren verschiedene Hypothesen [208]:

- CD44 könnte als Adhäsionsprotein wirken und somit zu verlängertem Kontakt zwischen TZR und MHC/Peptid-Komplex führen.
- Die CD44-Vernetzung könnte zum Umbau des Aktinskeletts und dessen Reorganisierung führen, welches den Kontakt zwischen T-Zelle und Antigen-präsentierender Zelle stabilisiert.
- Die CD44-Vernetzung könnte die Dichte von PTK am TZR erhöhen.
- Die Vernetzung von CD44 könnte durch die Akkumulation anderer kostimulatorischer Rezeptoren begleitet werden.

Auch wenn der molekulare Mechanismus derzeit noch unklar ist, unterstützen einige Publikationen die dritte Hypothese. Räumliche Nähe von CD44 zum intrazellulären Teil des TZR erhöht die Verfügbarkeit von LCK und dies führt wiederum zur Verstärkung der

Signalkaskade. Dieses Model wird auch dadurch gestützt, dass eine CD44-Vernetzung per se keine verstärkte Bindung von LCK auslöst [208]. Das heißt, der Phosphorylierungsstatus von LCK wird durch CD44 nicht beeinflusst.

Allein die Kokultur von allogenen dendritischen Zellen und T-Zellen führt zur Zellpolarisierung und der Akkumulation von CD44 an Kontaktbereichen zwischen T-Zelle und Antigen-präsentierender Zelle [212]. Ob die Bindung von Hyaluronsäure oder anderer Liganden hier eine Rolle spielt ist unklar. Die Rekrutierung von CD44 zu Kontaktbereichen könnte auch durch den Umbau des Zytoskeletts passieren oder passiv durch das zusammenfließen von *Lipid rafts*.

CD44 ist mit Glycolipid-reichen Membranbereichen assoziiert, sogenannten *Lipid rafts*. Wie bereits beschrieben, assoziiert es in diesen Bereichen mit LCK. Die Vernetzung des TZR führt zur Aggregation von *Lipid rafts* und verstärkt die Signaltransduktion durch unterschiedliche Prozesse, beispielsweise wird Tyrosinphosphorylierung gefördert, Signalmoleküle rekrutiert, und inhibitorisch wirkende Moleküle wie CD45 ausgeschlossen [213]. Ob eine Vernetzung von CD3 zur Aggregation von *Lipid rafts* führt, wird kontrovers diskutiert. Die divergierenden Ergebnisse könnten auf die Nutzung unterschiedlicher Marker für *Lipid rafts* zurückgeführt werden [zusammengefasst in 214]. Für CD59-enthaltende *Lipid rafts* konnte die Aggregation in Abhängigkeit von einer CD3-Stimulation bestätigt werden [215, 216]. Eben in diesen *Lipid rafts* ist auch CD44 lokalisiert [207].

#### CD44 ALS VERBINDUNG ZUM AKTINSKELETT

Die Bindung und Aktivierung von LCK führt auch zur Phosphorylierung von Ezrin/Radixin/Moesin (ERM)-Proteinen, welche als Verbindung zwischen Membranbereichen und Aktinskelett fungieren [zusammengefasst in 217]. Mehrfach konnte eine Assoziation von CD44 mit ERM-Proteinen nachgewiesen werden [218, 219]. Die Organisation des Zytoskeletts eröffnet eine weitere Möglichkeit wie CD44 Prozesse während der T-Zellaktivierung und der Auswanderung von T-Zellen kontrollieren kann.

#### 3.1.4 CD44 IN TH-ZELLEN

Bisher konnten keine TH-zellspezifischen CD44-Splicevarianten detektiert werden [220]. Allerdings existieren einige Studien über die Rolle von CD44 bei der TH-Differenzierung. Diese basieren auf Untersuchungen von CD44-KO Mäusen. Die Defizienz von CD44 führte bei verzögerten Hypersensitivitätsreaktionen zu einer verminderten TH1- und einer verstärkten TH2-Antwort. Ebenso konnte eine verminderte IL-17 Expression detektiert werden [221]. Eine weitere Untersuchung zeigte, dass *in vitro* polarisierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus CD44-KO Mäusen eine abgeschwächte IL-17 und IFN- $\gamma$  Produktion aufwiesen, IL-4 hingegen verstärkt exprimiert wurde. Folglich entwickelten CD44-KO Mäuse eine wesentlich mildere Form von experimenteller Autoimmunenzephalomyelitis (EAE). OPN förderte in dieser Studie die TH1/TH17-Polarisierung [222]. Eine Verbindung zwischen dem Überleben von TH1-Zellen und CD44 wurde von Baaten *et al.* untersucht. Die Immunantwort in einem Influenza-Modell war durch die CD44-Defizienz nicht betroffen. Es konnte jedoch bedingt durch eine erhöhte Apoptoserate kein Gedächtnis ausgebildet werden. CD44 trug in TH1- und in geringerem Ausmaß auch in TH17-Zellen zu einer erhöhten Überlebensrate bei [220]. Die genannten Publikationen zeigen, dass durch eine CD44-Defizienz vor allem die TH1- und TH17-

Differenzierung betroffen ist. Für Atemwegshypersensibilität wurde allerdings auch gegensätzliches publiziert, die Defizienz von CD44 inhibierte die  $T_H2$ -Antwort, IFN- $\gamma$  wurde jedoch verstärkt exprimiert [223].

Zusammengefasst lässt dies darauf schließen, dass die CD44-Defizienz, die für das jeweilige Modell typische  $T_H$ -Antwort abmildert und deshalb für alle untersuchten  $T_H$ -Zellen bedeutsam ist. Dies wird durch die Beobachtung unterstützt, dass CD44 für die Adhäsion am Endothel von  $T_H1$ - und  $T_H2$ -Populationen gleichermaßen wichtig war [224].

### 3.1.5 SPEZIFISCHE FRAGESTELLUNG

Der Einfluss von CD44 auf die  $T_H$ -Zelldifferenzierung wurde bisher ausschließlich an CD44-KO Mäusen untersucht. Hier konnte keine  $T_H$ -Population ausgemacht werden, die spezifisch durch die Defizienz beeinträchtigt ist. Vielmehr waren, in Abhängigkeit des Modells, verschiedene Subpopulationen beeinflusst (siehe 3.1.4).

Diese Studien untersuchten die CD44-Expression als Alles-oder-Nichts-Ereignis. Im Gegensatz dazu beschäftigt sich dieser Teil der Arbeit mit der graduellen Oberflächenexpression von CD44 auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen und dessen Einfluss auf die  $T_H$ -Zelldifferenzierung. Die initiale Beobachtung war, dass allorenreaktive  $T_H17$ -Zellen eine stärkere CD44-Oberflächenexpression als  $T_H1$ -Zellen aufwiesen. Zur weiteren Aufklärung dieser Beobachtung sollte folgende Frage beantwortet werden: Ist die verstärkte CD44-Oberflächenexpression charakteristisch für  $T_H17$ -Zellen und trifft dies auch für *in vivo* generierte  $T_H17$ -Zellen zu?

Wie in 3.1.3 bereits dargestellt, wurde der Aktivierungsmarker CD44 mit wesentlichen Schritten in der T-Zellaktivierung und ihrer Adhäsion in Verbindung gebracht. Es kann eine kostimulatorische Funktion übernehmen und damit unter schwachen Stimulationsbedingungen die Signaltransduktion verstärken [208]. In diesem Zusammenhang sollte die Frage beantwortet werden, ob CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit einer erhöhten CD44-Oberflächenexpression eine stärkere Signaltransduktion aufweisen. Darüber hinaus wurde untersucht, ob Bedingungen in der CD44 eine kostimulatorische Funktion ausüben kann, die  $T_H17$ -Differenzierung fördern könnte.

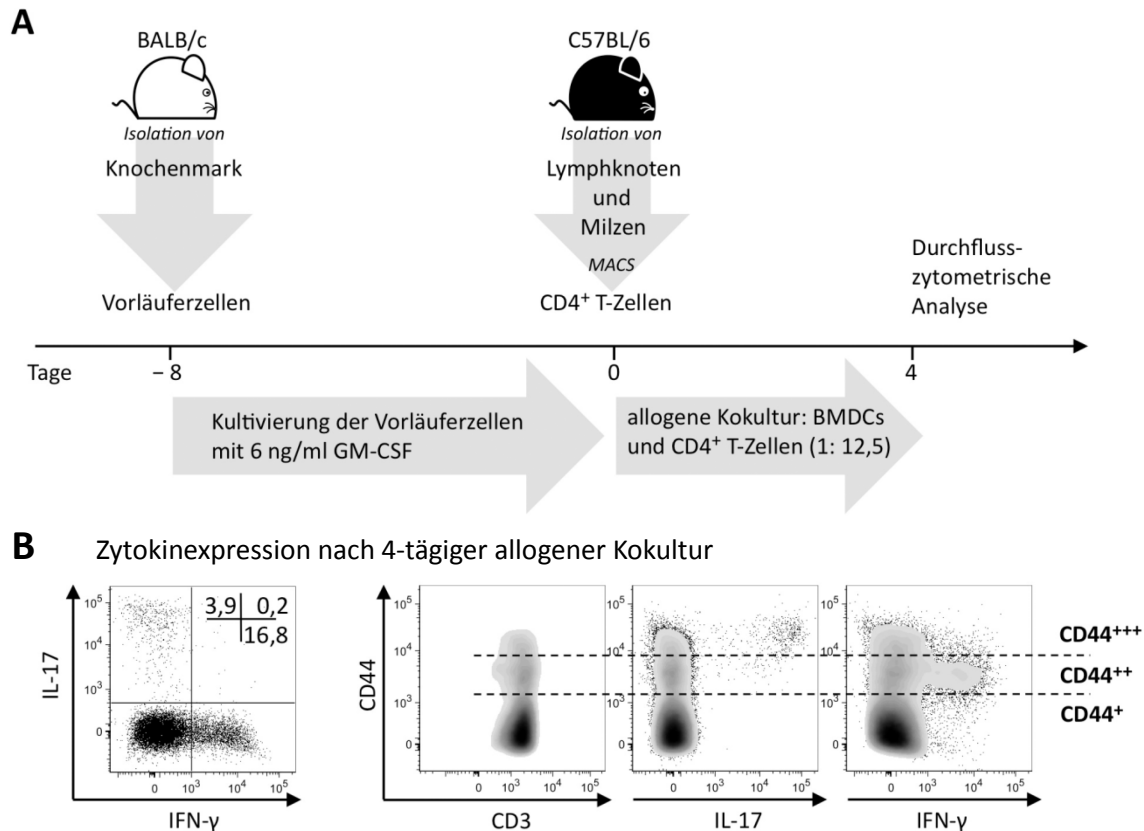




## 3.2 ERGEBNISSE

### 3.2.1 ALLOREAKTIVE TH1 UND TH17-ZELLEN UNTERSCHIEDEN SICH IN IHRER CD44-EXPRESSION *IN VITRO* UND *IN VIVO*

Aufgereinigte CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit allogenen BMDCs über einen Zeitraum von 4 Tagen stimuliert. Zur Detektion von IL-17 und IFN- $\gamma$  wurde eine intrazelluläre Zytokinfärbung vorgenommen. Der experimentelle Aufbau ist in Abbildung 3-2 A dargestellt.



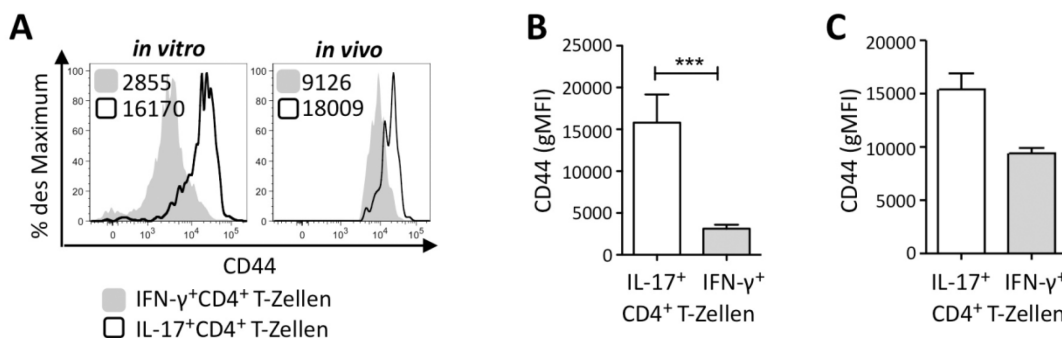
**Abbildung 3- 2. Experimenteller Aufbau und CD44-Subpopulationen nach 4-tägiger allogener Kokultur.**

**A** Vorläuferzellen wurden aus dem Knochenmark von BALB/c Mäusen gewonnen und 8 Tage in Gegenwart von GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) kultiviert. Die generierten BMDCs wurden am Tag 0 mit magnetisch sortierten (MACS) CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Milz und Lymphknoten von C57BL/6 Mäusen im Verhältnis 1:12,5 ausplattiert. Die Analyse der Kokultur erfolgte 4 Tage später mittels Durchflusszytometrie. **B** Dargestellt ist ein repräsentatives Streudiagramm, das IL-17<sup>+</sup> und IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen zeigt (Verteilung in den Quadranten: % bezogen auf eine Gesamtheit von CD3<sup>+</sup> Zellen). Nach 4-tägiger Kokultur lassen sich CD4<sup>+</sup> T-Zellen hinsichtlich der CD44-Expression in 3 Populationen unterteilen: CD44<sup>+</sup>, CD44<sup>++</sup> und CD44<sup>+++</sup>. Dargestellt sind drei repräsentative Streudiagramme in denen die CD44-Expression in Relation zu CD3, IL-17 und IFN- $\gamma$  gezeigt wird (alle Diagramme beziehen sich auf eine Gesamtheit von CD3<sup>+</sup> Zellen).

Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden aus der Kokultur nach vier Tagen geerntet. Die meisten BMDCs blieben fest am Boden der Zellkulturplatte haften. Um dennoch eine Kontamination in der folgenden Analyse zu vermeiden, wurden die Proben mit  $\alpha$ CD3 gegengefärbt. Da die Zellen zuvor mittels CD4<sup>+</sup> T-Zellisoliationskit sortiert wurden, werden sie im Folgenden als CD4<sup>+</sup> T-Zellen (bzw. TH-Zellen) bezeichnet. Von allen dargestellten Populationen wurden Doubletten

und tote Zellen ausgeschlossen (vgl. 5.10). Nach 4-tägiger allogener Kokultur lassen sich hinsichtlich der CD44-Expression drei Populationen unterscheiden: CD44<sup>+</sup>, CD44<sup>++</sup> und CD44<sup>+++</sup> (Abb. 3-2 B). Zytokinproduzierende CD4<sup>+</sup> T-Zellen (IL-17 und IFN- $\gamma$ ) gehen mit einer erhöhten CD44-Expression einher (Abb. 3-2 B).

IL-17- und IFN- $\gamma$ -produzierende CD4<sup>+</sup> T-Zellen unterschieden sich in ihrer CD44-Oberflächenexpression: IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen waren eher in der intermediär CD44-exprimierenden Population (CD44<sup>++</sup>) zu finden, IL-17<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen dagegen in der CD44<sup>+++</sup> Population (3-3 A: gMFI von CD44: IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (*in vitro*): 2855; IL-17<sup>+</sup> (*in vitro*): 16170). Dieser Effekt war sehr reliabel und die Unterschiede zwischen IL-17<sup>+</sup> und IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen daher hochsignifikant (Abb. 3-3 B: CD44 gMFI als M  $\pm$  SEM: IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>: 3126  $\pm$  473; IL-17<sup>+</sup>: 15804  $\pm$  3367;  $p < 0,001$ ).



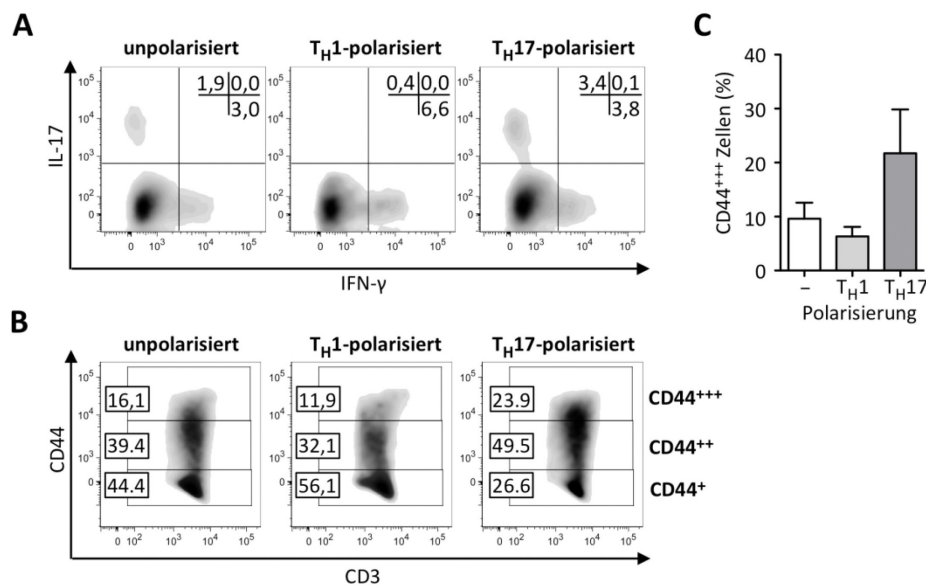
**Abbildung 3- 3. CD44-Oberflächenexpression unterscheidet alloreaktive Th1- von Th17-Zellen.**

**A** Repräsentative durchflusszytometrische Aufnahme der CD44-Expression in IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (grau, ausgefüllt) und IL-17<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen (schwarze Linie) *in vitro* und *in vivo*. Im Histogramm sind die Werte für das gMFI von CD44 angegeben. **B** CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit allogenen BMDCs für vier Tage stimuliert und intrazellulär für die Zytokine IL-17 und IFN- $\gamma$  gefärbt. Angegeben sind die Werte für das gMFI von CD44 für beide Populationen (n = 13; Balken repräsentieren Mittelwerte (M)  $\pm$  SEM; Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test: \*\*\* $p < 0,001$ ). **C** Detektion von *in vivo* entstandenen IL17<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> und IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach allogener Hauttransplantation. Dargestellt ist das gMFI von CD44 für beide Populationen (n = 4; Balken repräsentieren Mittelwerte (M)  $\pm$  SEM; Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test: n.s.). *In vivo*-Daten wurden freundlicherweise von Katarina Stanko (Institut für Medizinische Immunologie, Charité Berlin) zur Verfügung gestellt.

Im folgenden Schritt sollte überprüft werden, ob sich dieser Effekt auch für *in vivo* generierte alloreaktive CD4<sup>+</sup> T-Zellen wiederholen ließ. C57BL/6 Mäuse erhielten ein allogenes Hauttransplantat von BALB/c Mäusen. 7-28 Tage nach der Transplantation wurden Zellen aus den drainierenden Lymphknoten dieser Tiere isoliert und deren Zytokinexpression bestimmt. Auch *in vivo* differenzierte IL-17<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen zeigten eine höhere CD44-Oberflächenexpression als IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 3-3 A *in vivo*, CD44 gMFI von IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>: 9126, CD44 gMFI von IL-17<sup>+</sup>: 18009). Der Unterschied bildete sich im Vergleich zu *in vitro* differenzierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen nicht so stark heraus, da *in vivo* differenzierte IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine höhere CD44-Expression aufwiesen als *in vitro* (Abb. 3-3 C: CD44 gMFI als M  $\pm$  SEM: IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (*in vivo*): 9361  $\pm$  712; IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (*in vitro*): 3126  $\pm$  473).

### 3.2.2 POLARISIERENDE BEDINGUNGEN VERSTÄRKEN DIE UNTERSCHIEDE IN DER CD44-EXPRESSION ZWISCHEN TH17- UND TH1-ZELLEN

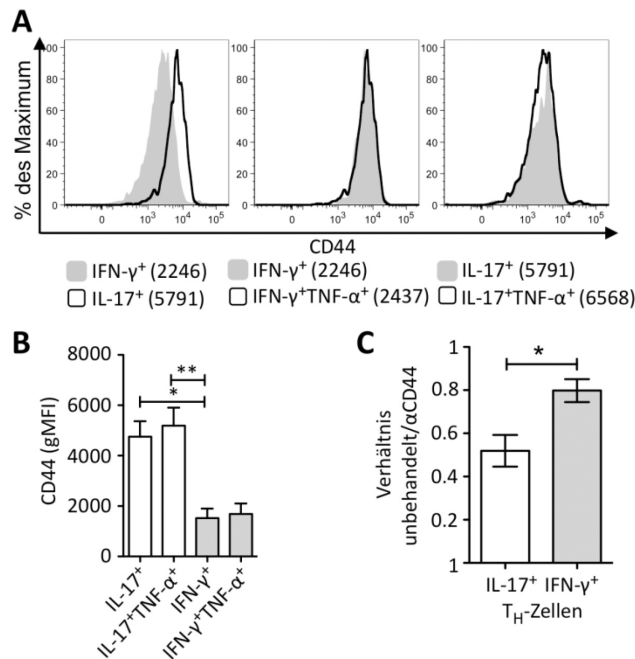
Sollten TH17-Zellen durch eine höhere CD44-Expression charakterisiert sein, dann könnten polarisierende Bedingungen diesen Phänotyp noch verstärken. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden aufgereinigte allogen-stimulierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit einem Gemisch aus TH1-polarisierenden (IL-12 und  $\alpha$ IL-4) oder TH17-polarisierenden (IL-6, IL-23, TGF- $\beta$ ,  $\alpha$ IL-4 und  $\alpha$ IFN- $\gamma$ ) Zytokinen und neutralisierenden Antikörpern vier Tage in Anwesenheit von allogenen BMDCs stimuliert. Das veränderte Zytokinmuster nach der jeweiligen Polarisation ist in Abbildung 3-4 A gezeigt.



**Abbildung 3- 4. Polarisierende Bedingungen führen zu Unterschieden in der CD44-Expression von CD4<sup>+</sup> T-Zellen.** CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit allogenen BMDCs für vier Tage unter unpolarisierenden, TH1- und TH17-polarisierten Bedingungen stimuliert. **A** Repräsentative Darstellung von alloreaktiven T-Zellen hinsichtlich der IL-17- und IFN- $\gamma$ -Expression nach unterschiedlichen Polarisierungsbedingungen (Zellverteilung in den Quadranten: % bezogen auf eine Gesamtheit von CD3<sup>+</sup> Zellen). **B** Verteilung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen gemäß ihrer CD44-Expression in % (CD44<sup>+</sup>, CD44<sup>++</sup> und CD44<sup>+++</sup>) unter verschiedenen Polarisierungsbedingungen. **C** Anzahl der CD4<sup>+</sup> T-Zellen der CD44<sup>+++</sup> Population nach unterschiedlichen Polarisierungsbedingungen (n = 6-9; Balken repräsentieren Mittelwerte (M)  $\pm$  SEM; Kruskal-Wallis-Test und *post-hoc* Dunns Vergleich: n.s.).

Unter TH1-polarisierenden Bedingungen kam es zu einer Vermehrung von alloreaktiven IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen und unter TH17-polarisierenden Bedingungen zu einer Vermehrung von alloreaktiven IL-17<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Im Unterschied zu Polarisierungen unter polyklonaler Stimulation ist die Anzahl an TH1 und TH17-Zellen nach allogener Stimulation geringer [225]. Insbesondere bei TH17-Zellen liegt es vermutlich daran, dass sich eine IFN- $\gamma$  Produktion nicht unterdrücken lässt [13]. Eine TH1-Polarisierung führte tatsächlich zu einer Reduktion der CD44<sup>+++</sup> Population (Abb. 3-4 B und C: CD44<sup>+++</sup> TH-Zellen als M  $\pm$  SEM: unpolarisiert: 9,6 %  $\pm$  2,99; TH1-polarisiert: 6,33 %  $\pm$  1,76), während eine TH17-Polarisierung die Anzahl der Zellen dieser Population erhöhte (Abb. 3-4 C: TH17-polarisiert: 21,74 %  $\pm$  8,12). Dennoch exprimierten nur eine kleine Anzahl der Zellen in dieser Population tatsächlich IL-17.

Um zu überprüfen, ob dieser Phänotyp charakteristisch für  $T_H17$ - bzw. für  $T_H1$ -Zellen ist, wurde die Expression von  $TNF-\alpha$  gemessen, von dem bekannt ist, dass es sowohl von  $T_H17$ - als auch  $T_H1$ -Zellen exprimiert wird [226]. Die Hypothese unterstützend, zeigten IL-17/ $TNF-\alpha$ -doppelpositive  $CD4^+$  T-Zellen eine vergleichbare CD44-Expression zu IL-17-Einzelproduzenten (Abb. 3-5 B: gMFI von CD44 als  $M \pm SEM$ : IL-17 $^+$  $TNF-\alpha^+$ :  $5187 \pm 720$ ; IL-17 $^+$ :  $4756 \pm 613$ ). Das Gleiche konnte für IFN- $\gamma^+$  und IFN- $\gamma^+$  $TNF-\alpha^+$   $T_H$ -Zellen gezeigt werden (Abb. 3-5 A und B: gMFI von CD44 als  $M \pm SEM$ : IFN- $\gamma^+$  $TNF-\alpha^+$ :  $1689 \pm 412$ ; IFN- $\gamma^+$ :  $1523 \pm 376$ ).

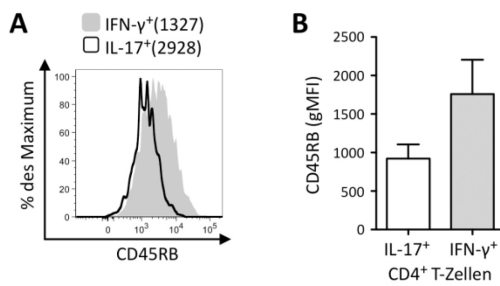


**Abbildung 3- 5. Die  $TNF-\alpha$ -Expression bestimmt nicht die differenzielle CD44-Expression von  $T_H1$ - und  $T_H17$ -Zellen.** A IL-17 $^+$  und IFN- $\gamma^+$ -einzelpositiv sowie IL-17 $^+$  $TNF-\alpha^+$ - und IFN- $\gamma^+$  $TNF-\alpha^+$ -doppelt-positive  $CD4^+$  T-Zellen sind im Histogramm hinsichtlich ihrer CD44-Expression dargestellt. B Das gMFI für CD44 der folgenden Populationen ist dargestellt: IL-17 $^+$ -, IFN- $\gamma^+$ -einzelpositiv, IL-17 $^+$ / $TNF-\alpha^+$ - und IFN- $\gamma^+$ / $TNF-\alpha^+$ -doppeltpositive  $CD4^+$  T-Zellen (n = 5; Friedmann-Test und *post-hoc* Dunns Vergleich: \*\* $p \leq 0,01$  (zwischen IL-17 $^+$ / $TNF-\alpha^+$  und IFN- $\gamma^+$ ); \* $p \leq 0,05$  (zwischen IL-17 $^+$  und IFN- $\gamma^+$ )). C Verhältnis von IL-17- bzw. IFN- $\gamma$ -Produzenten aus unbehandelten und  $\alpha CD44$ -behandelten Kokulturen (n = 5; Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test: \* $p \leq 0,05$ ). Balken repräsentieren Mittelwerte (M)  $\pm$  SEM.

### 3.2.3 DIE BLOCKIERUNG VON CD44 VERRINGERT DIE ANZAHL VON IL-17 $^+$ - ABER NICHT VON IFN- $\gamma^+$ $CD4^+$ T-ZELLEN

Wenn eine hohe CD44-Expression für die IL-17 Produktion wichtig wäre, dann könnte eine Blockierung von CD44 IL-17-Produzenten stärker beeinflussen als IFN- $\gamma$ -Produzenten. Um dies zu untersuchen wurde der allogenen Kokultur zu Beginn 10  $\mu g/ml$  eines blockierenden  $\alpha CD44$ -Antikörper zugegeben und die Bildung von IL-17 $^+$ - und IFN- $\gamma^+$  $CD4^+$  T-Zellen nach 4 Tagen im Vergleich zu einer unbehandelten Kultur untersucht. Nach einer Blockierung von CD44 konnten sich zwar immer noch IL-17 $^+$  $CD4^+$  T-Zellen entwickeln, allerdings weniger als in unbehandelten Kokulturen. Darüber hinaus waren sie verglichen mit IFN- $\gamma^+$  $CD4^+$  T-Zellen von der Behandlung stärker benachteiligt (Abb. 3-5 C:  $M \pm SEM$ : IL-17 $^+$  $CD4^+$ :  $0,52 \pm 0,07$ ; IFN- $\gamma^+$  $CD4^+$ :  $0,8 \pm 0,12$ ;  $p \leq 0,05$ ).

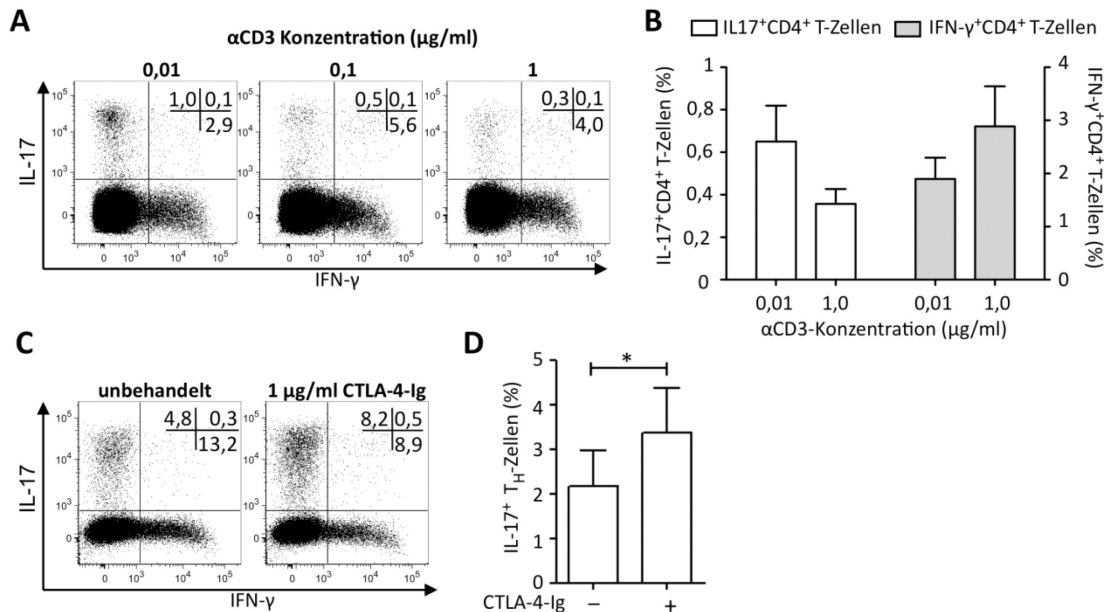
Eine höhere CD44-Expression könnte als Anzeichen für eine stärkere Zellaktivierung gesehen werden. Andere Oberflächenmoleküle werden infolge der Zellaktivierung eher herunterreguliert, wie beispielsweise CD45RB [227]. Im folgenden Schritt wurde deshalb überprüft, ob sich  $T_H1$ - und  $T_H17$ -Zellen auch in der CD45RB-Oberflächenexpression unterscheiden. Tatsächlich zeigten IL17 $^+$  $CD4^+$  T-Zellen eine geringere CD45RB-Expression als IFN- $\gamma^+$  (Abb. 3-6 A und B: gMFI von CD45RB: IL17 $^+$  $CD4^+$ :  $921 \pm 183$ ; IFN- $\gamma^+$  $CD4^+$ :  $1760 \pm 444$ ;  $p = 0,06$ ).



**Abbildung 3- 6. CD45RB-Expression von TH1- und TH17-Zellen.** **A** Repräsentative Darstellung der IL17+ und IFN- $\gamma$ +CD4+ T-Zellen hinsichtlich ihrer CD45RB-Expression (gMFI von CD45RB). **B** GMFI von CD45RB der IL17+ und IFN- $\gamma$ +CD4+ T-Zellen ( $n = 5$ ; Balken repräsentieren Mittelwerte (M)  $\pm$  SEM; Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test:  $p = 0,06$ ).

### 3.2.4 EINE GERINGE TZR- UND KOSTIMULATION UNTERSTÜTZT DIE TH17-DIFFERENZIERUNG

Wie unter 3.1.3 beschrieben, kann CD44 als kostimulatorisches Molekül während der Zellaktivierung wirken. Der größte stimulatorische Effekt zeigte sich vor allem bei einer schwachen TZR-Stimulation [208]. Um zu überprüfen, ob diese Bedingungen auch eine TH17-Differenzierung fördern können, wurden Milzzellen polyklonal mit unterschiedlichen Mengen an  $\alpha$ CD3-Antikörpern stimuliert. Ein allogenes Modell wäre in diesem Fall ungeeignet, da sich die Dosis schwer bestimmen lässt.



**Abbildung 3- 7. Geringe TZR- und Kostimulation fördern die TH17-Differenzierung.** Milzzellen wurden mit unterschiedlichen Mengen  $\alpha$ CD3 stimuliert (0,01; 0,1; und 1  $\mu$ g/ml). **A** und **B** Dargestellt ist die IL-17- und IFN- $\gamma$ -Expression von CD4+ T-Zellen als repräsentative Streudiagramme eines Experiments (**A**) und zusammengefasst als Balkendiagramm (**B**) für 0,01 und 1  $\mu$ g/ml ( $n = 6$ , Balken repräsentieren Mittelwerte (M)  $\pm$  SEM; Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test: zwischen IL-17-Produzenten: n.s.; zwischen IFN- $\gamma$ -Produzenten:  $p = 0,06$ ). **C** und **D** Allogene Stimulation von CD4+ T-Zellen mit und ohne CTLA-4-Ig. Dargestellt ist die IL-17- und IFN- $\gamma$ -Expression von CD4+CD44+ T-Zellen als repräsentative Streudiagramme (**C**) und zusammengefasst im Balkendiagramm (**D**) in Abhängigkeit von der CTLA-4-Ig Behandlung ( $n = 7$ , Balken repräsentieren Mittelwerte (M)  $\pm$  SEM; Wilcoxon-Vorzeichen-Rang Test: \* $p \leq 0,05$ ).

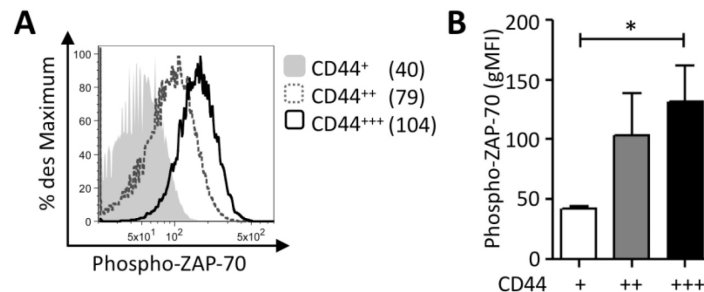
Wie in Abbildung 3-7 A und B gezeigt, förderten schwächere Stimulationsbedingungen die Bildung von IL-17+CD4+ T-Zellen (Abb. 3-7 B: % IL-17+CD4+ T-Zellen als M  $\pm$  SEM; 0,01  $\mu$ g/ml  $\alpha$ CD3: 0,65 %  $\pm$  0,17; 1  $\mu$ g/ml  $\alpha$ CD3: 0,36 %  $\pm$  0,07). Damit einher ging eine

Verringerung der Anzahl an IFN- $\gamma$ +CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 3-7 B: % IFN- $\gamma$ +CD4<sup>+</sup> T-Zellen als M  $\pm$  SEM: 0,01  $\mu$ g/ml  $\alpha$ CD3: 1,9 %  $\pm$  0,4; 1  $\mu$ g/ml  $\alpha$ CD3: 2,89 %  $\pm$  0,75;  $p$  = 0,06).

Um zu überprüfen, ob eine verringerte CD28-Kostimulation Einfluss auf die Bildung von IL-17+CD4<sup>+</sup> T-Zellen haben könnte, wurden allogene Kokulturen mit CTLA-4-Ig (*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4-immunoglobulin*) behandelt. Durch die Bindung an CD80 und CD86 blockiert es deren Bindung an CD28 auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Anders als bei einer Blockierung durch spezielle  $\alpha$ CD28-Antikörper konnte somit eine stimulatorische Wirkung durch CD28 ausgeschlossen werden. Eine Blockierung des CD28-vermittelten kostimulatorischen Signals erhöhte die Anzahl an IL-17+CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 3-7 C und D: % IL-17+CD4<sup>+</sup> T-Zellen als M  $\pm$  SEM: unbehandelt: 2,17 %  $\pm$  0,79; 1  $\mu$ g/ml CTLA-4-Ig: 3,37 %  $\pm$  0,1.0;  $p$   $\leq$  0,05).

### 3.2.5 EINE HOHE CD44-OBERFLÄCHENEXPRESSION KORRELIERT POSITIV MIT DEM LEVEL AN PHOSPHO-ZAP-70

Es wurde beschrieben, dass CD44 (bzw. Membranbereiche in denen CD44 lokalisiert ist) durch die Assoziation mit LCK zur Signaltransduktion beiträgt [208]. Sollte CD44 als kostimulatorisches Molekül in CD44<sup>+++</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen wirken, könnte eine Erhöhung der LCK-Dichte an der immunologischen Synapse dazu beitragen, dass die nachgeschaltete Signalkaskade verstärkt wird. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde die basale ZAP-70-Phosphorylierung einen Tag nach allogener Kokultur gemessen. Tatsächlich wies die CD44<sup>+++</sup> Population die höchste basale ZAP-70-Phosphorylierung auf gefolgt von den CD44<sup>++</sup> und CD44<sup>+</sup> Populationen (Abb. 3-8 A und B: Phospho-ZAP-70 gMFI als M  $\pm$  SEM: CD44<sup>+</sup>: 42,0  $\pm$  1,18; CD44<sup>++</sup>: 103,8  $\pm$  19,8; CD44<sup>+++</sup>: 131,3  $\pm$  17,17).



**Abbildung 3- 8. Basale ZAP-70-Phosphorylierung in CD44-exprimierenden Populationen.** **A** Dargestellt ist die basale ZAP-70-Phosphorylierung von CD44<sup>+</sup> (grau, ausgefüllt), CD44<sup>++</sup> (graue, unterbrochene Linie) und CD44<sup>+++</sup> (schwarze Linie) T<sub>H</sub>-Zell Populationen als repräsentatives Histogramm (gMFI von Phospho-ZAP-70). **B** Zusammenfassung der basalen Zap-70-Phosphorylierung von CD44<sup>+</sup>, CD44<sup>++</sup> und CD44<sup>+++</sup> T<sub>H</sub>-Zell Populationen im Balkendiagramm (n = 3, Balken repräsentieren Mittelwerte (M)  $\pm$  SEM; Friedman-Test und *post-hoc* Dunns Vergleich: \* $p$   $\leq$  0,05 (zwischen CD44<sup>+</sup> und CD44<sup>+++</sup>)).

### 3.3 DISKUSSION

Nach 4-tägiger allogener Kokultur von BALB/c BMDCs mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus C57BL/6 konnten hinsichtlich der CD44-Oberflächenexpression drei Subpopulationen unterschieden werden: CD44<sup>+++</sup>, CD44<sup>++</sup> und CD44<sup>+</sup>. Alloreaktive TH17-Zellen waren vorwiegend innerhalb der Subpopulation mit der stärksten CD44-Expression (CD44<sup>+++</sup>) zu finden. Das unterschied sie von alloreaktiven TH1-Zellen, welche eine intermediäre CD44-Oberflächenexpression aufwiesen (CD44<sup>++</sup>). Dies konnte nicht nur für *in vitro* generierte Zellen gezeigt werden, es traf ebenfalls für *in vivo* differenzierte alloreaktive Zellen dieser TH-Subpopulationen zu. Zudem konnte dieses Muster durch polarisierende Bedingungen verstärkt werden. Eine TH1-Polarisierung führte zu einer Reduktion der CD44<sup>+++</sup> Population, während eine TH17-Polarisierung die Anzahl der Zellen in dieser Population erhöhte. Zudem beeinträchtigte eine CD44-Blockierung TH17-Zellen stärker als TH1.

Die unterschiedliche CD44-Oberflächenexpression ist von TNF- $\alpha$  unabhängig. Dieses Zytokin wird zwar von beiden Subpopulationen exprimiert, Doppelproduzenten (IL-17+TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> bzw. IFN- $\gamma$ +TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>) jedoch wiesen die gleiche CD44 Oberflächenexpression auf wie die entsprechenden Einzelproduzenten (IL-17<sup>+</sup> bzw. IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>).

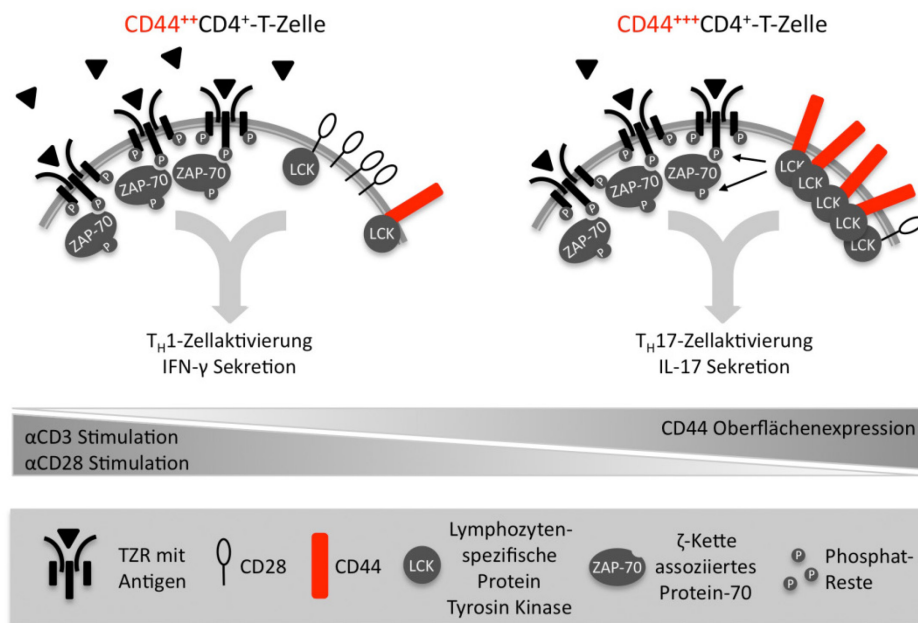


Abbildung 3- 9. Schema zum Einfluss von CD44 auf die Aktivierung und Differenzierung von T<sub>H</sub>-Zellen

Eine erhöhte CD44-Expression auf T<sub>H</sub>17-Zellen legte die Vermutung nahe, dass diese eine stärkere Zellaktivierung als T<sub>H</sub>1-Zellen aufwiesen. Dies konnte zusätzlich durch die Bestimmung der ZAP-70-Phosphorylierung nach allogener Kokultur bestätigt werden. Jedoch hatten T<sub>H</sub>17- verglichen mit T<sub>H</sub>1-Zellen einen Vorteil bei geringer TZR- und Kostimulation. Es ist bekannt, dass unter eben diesen Bedingungen CD44 als kostimulatorisches Molekül wirken und zum Teil CD28 ersetzen kann [208]. Zudem ist CD44 mit LCK assoziiert, einer ZAP-70 vorgeschalteten Tyrosinkinase [206–208]. Zusammengefasst lassen diese Daten darauf schließen, dass T<sub>H</sub>17-Zellen unter bestimmten Stimulationsbedingungen einen Vorteil

gegenüber T<sub>H</sub>1-Zellen haben. Diese Bedingungen führten in T<sub>H</sub>17-Zellen allerdings nicht zu einer verminderten Zellaktivierung, sondern das Gegenteil war der Fall. CD44 als ein alternatives kostimulatorisches Molekül konnte zur Verstärkung der T-Zellaktivierung beitragen (zusammenfassend dargestellt in Abb. 3-9).

### 3.3.1 SIGNALTRANSDUKTION VIA CD44

Eine erhöhte CD44-Oberflächenexpression von T<sub>H</sub>17-Zellen gegenüber T<sub>H</sub>1-Zellen lässt auf eine stärkere Zellaktivierung schließen. Unterstützt wird diese Annahme durch folgende Beobachtungen. Im Gegensatz zur erhöhten CD44-Expression zeigten T<sub>H</sub>17-Zellen eine Reduktion der CD45RB-Oberflächenexpression. CD45 kann die Signaltransduktion durch die Dephosphorylierung inhibitorischer bzw. aktivierender Tyrosinreste von LCK sowohl positiv als auch negativ beeinflussen. Ein aktuelles Model beschreibt, dass CD45 in naiven Zellen LCK positiv reguliert, während es in aktivierten Zellen durch Dephosphorylierung aktivierender Reste LCK eher negativ auf die Zellaktivierung wirkt [228]. Interessanterweise ist in CD45<sup>-</sup> T-Zellen ein größerer Anteil an LCK mit CD44 in *Lipid rafts* assoziiert [229]. Zudem wird die Isoform CD45RB während der T-Zellaktivierung herunterreguliert [227]. Zwar gibt dies keinen Aufschluss auf die Gesamtexpression von CD45 (das heißt, alle Isoformen einschließend), allerdings wird die negative Rolle von CD45 während der Zellaktivierung auch dadurch deutlich, dass es bei der Interaktion zwischen T-Zelle und Antigen-präsentierender Zelle aufgrund des großen extrazellulären Bereiches von CD45 aus der zentralen Zone verdrängt wird [5]. Über mehrere Mechanismen kann so eine verringerte CD45-Expression mit einer verstärkten Zellaktivierung aber auch einer verstärkten CD44-Kostimulation in Verbindung gebracht werden.

Zudem konnte eine verstärkte ZAP-70-Phosphorylierung innerhalb der CD44<sup>+++</sup> Population gemessen werden. Die Phosphorylierung von ZAP-70 ist eines der ersten Ereignisse nach der TZR-Stimulation und LCK nachgeschaltet. Es bindet an durch LCK phosphorylierte ITAM-Motive des TZR und wird dann selbst durch LCK phosphoryliert. LCK ist wiederum mit CD44 in *Lipid rafts* assoziiert [206–208]. Die erhöhte ZAP-70-Phosphorylierung unterstützt deshalb die Annahme, dass T<sub>H</sub>17, die sich vorwiegend in der CD44<sup>+++</sup> Population befinden, eine stärkere T-Zellaktivierung aufweisen.

### 3.3.2 EXTRAZELLULÄRE STIMULI

Die intrazelluläre Signalkaskade nach TZR-Stimulation kann durch CD44 begünstigt werden. Auch für den Kontakt von T-Zelle und Antigen-präsentierender Zelle sowie die Bildung einer immunologischen Synapse ist CD44 wichtig. Allerdings existieren zum Teil widersprüchliche Daten darüber, ob die CD44-Expression seitens dendritischer oder T-Zelle notwendig ist [210, 212]. Ebenso stellt sich die Frage, ob eine direkte Interaktion zwischen T-Zelle und Antigen-präsentierender Zelle direkt über CD44 erfolgt oder CD44 passiv zu aktiven Bereichen rekrutiert wird, beispielsweise durch die Akkumulation von *Lipid rafts*.

Die Aktivierung der CD44-nachgeschalteten Signalkaskade könnte über CD44-Liganden wie OPN und HA erfolgen. Eine erhöhte OPN-Konzentration wurde mit einer verstärkten T<sub>H</sub>17-Polarisierung assoziiert [222]. Die Zugabe von OPN zu allogenen Kokulturen führte allerdings nicht zur Erhöhung der Anzahl an T<sub>H</sub>17-Zellen (eigene Beobachtungen, Daten nicht gezeigt). Da sowohl T-Zellen als auch dendritische Zellen CD44 exprimieren, könnte eine Interaktion zwischen beiden über HA als Brücke vermittelt werden [202]. Obwohl kein



exogenes HA zur allogenen Kokultur zugegeben wurde, ist es möglich, dass eine Interaktion darüber stattfindet, denn für murine BMDCs wurde eine aktive Synthese von HA nachgewiesen [230].

Bisher konnte jedoch nicht gezeigt werden, dass die Bindung eines Liganden eine Signaltransduktion über CD44 (durch beispielsweise eine Konformationsänderung) auslösen kann. Vielmehr zeigen die meisten Arbeiten intrazelluläre Reaktionen infolge eines CD44-*Clusterings*. Dies könnte passiv durch ein Zusammenfließen von *Lipid rafts* erfolgen. Infolgedessen könnte CD44 die intrazelluläre Verfügbarkeit von Signalmolekülen wie LCK erhöhen, indem es diese Moleküle in eine räumliche Nähe zum TZR bringt.

### 3.3.3 TH17-ZELLEN PROFITIEREN VON EINER ERHÖHTEN CD44-EXPRESSION

Wie bereits beschrieben, kann CD44 als kostimulatorisches Molekül wirken und damit Einfluss auf die Signaltransduktion nehmen [208, 231]. Dies wirft die Frage auf, unter welchen Bedingungen eine erhöhte CD44-Expression und Zellaktivierung für TH17-Zellen nützlich sein kann.

Die Differenzierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in verschiedene TH-Subpopulationen ist von Bedingungen wie der Länge des Stimulus und dem Zytokinmilieu abhängig. Darüber hinaus kann die Stärke der T-Zellaktivierung die TH-Differenzierung beeinflussen [55, 232, 233]. Hierbei sind veränderte Kostimulation, Antigendosis, TZR-Affinität oder Stimulationsdauer als Mechanismen möglich [55, 225].

Eine geringere Signalstärke kann die Differenzierung von TH17-Zellen fördern [225]. Tatsächlich zeigten diese Studien eine erhöhte Anzahl an TH17-Zellen infolge einer geringeren  $\alpha$ CD3-Dosis oder Anzahl Antigen-präsentierender Zellen. Dies deckt sich mit eigenen Beobachtungen (Abb. 2-8). Zudem konnte kein Unterschied in der Kerntranslokation von NFAT unter schwachen oder starken Stimulationsbedingungen detektiert werden. Dies unterstützt die Vermutung, dass eine geringere TZR-Stimulation sich nicht notwendigerweise in einer verminderten intrazellulären Aktivierung niederschlägt, sondern kompensiert werden kann.

Der Einfluss von CD44 auf die TH-Zelldifferenzierung scheint vom untersuchten Modell abhängig zu sein (vgl. Abschnitt 2.1.4). Baaten *et al.* behaupteten keine Unterschiede in der CD44-Expression zwischen TH-Zell Populationen gefunden zu haben allerdings wurden die Daten hierzu nicht in der Publikation gezeigt [220].

Die Ergebnisse unterstützen ein Modell nachdem eine hohe CD44-Expression auf TH17-Zellen die T-Zellaktivierung fördern und somit TH17-Zellen einen Vorteil bei einer niedrigen Antigendosis ermöglichen könnte.

### BENÖTIGEN TH17-ZELLEN EIN STARKES ODER SCHWACHES TZR-SIGNAL?

Hochaffine Liganden fördern eher die Bildung von TH1- als TH2-Zellen [233, 234]. Eine erhöhte Dosis löslicher Antigene führt zur TH1-Differenzierung, hohe Dosen von parasitärer Antigene dagegen eine TH2-Antwort [55]. Auch bleiben generelle Aussagen über Bedingungen hinsichtlich Signalstärke und Kostimulation für eine TH17-Differenzierung umstritten. Es wurde sowohl eine positive Korrelation zwischen Antigendosis und TH17-Differenzierung [235, 236] als auch eine negative Korrelation beschrieben [225, eigene Daten].

Obwohl eine geringere TZR-Dosis möglicherweise nicht grundsätzlich eine Voraussetzung für die  $T_H17$ -Differenzierung darstellt, konnten einige Publikationen eine verstärkte intrazelluläre Signalkaskade in  $T_H17$ -Zellen finden. Beispielsweise führte die Defizienz der induzierten T-Zell Kinase (Itk) zu einem verminderten IL-17 Level [236]. Auch Raftlin-KO Mäuse produzieren weniger IL-17. Raftlin, ein in *Lipid rafts* lokalisiertes Protein, ist an Prozessen zur Regulierung der TZR-Signalstärke beteiligt. Eine Überexpression verstärkt die TZR-Signalkaskade und damit die  $T_H17$ -Differenzierung unter geringer Antigen-Dosis. Da Raftlin-enthaltende *Lipid rafts* eine hohe Assoziation von LCK aufweisen, ist anzunehmen, dass die Signalstärke über die Verfügbarkeit von LCK reguliert wird [237]. Daten dieser Arbeit unterstützen die Annahme, dass  $T_H17$ -Zellen eine starke intrazelluläre Aktivierung aufweisen. Dies kann durch ein starkes TZR-Signal ausgelöst werden [235, 236]. Falls das jedoch nicht gewährleistet ist, können kostimulatorische Moleküle, wie CD44 und Raftlin, Signale verstärken und somit die Differenzierung von  $T_H17$ -Zellen fördern. Andere PTK wiederum inhibieren die  $T_H17$ -Differenzierung [238]. Interessanterweise zeigte diese Studie, dass die Inhibierung einer  $T_H17$ -Differenzierung mit einer verminderten Anzahl an stark CD44-exprimierenden Zellen einherging [238].

Auch für verschiedene kostimulatorische Moleküle, wie CD28 und ICOS, wurde ein Einfluss auf die  $T_H17$ -Entwicklung beschrieben [13]. Jedoch existieren sowohl für die Beteiligung von ICOS [239, 240] als auch für CD28 kontroverse Daten [225, 241]. Die hier gezeigten Daten, sowie verschiedene *in vivo* Befunde, unterstützen die Annahme, dass eine geringere CD28-Stimulation die  $T_H17$ -Differenzierung fördert. Beispielsweise verstärkte die Verabreichung von CTLA-4-Ig EAE [242]. Darüber hinaus zeigte eine Phase III Studie an Nierentransplantationspatienten einen dosisabhängigen Anstieg von akuter Abstoßungsereignissen nach CTLA-4-Ig-Verabreichung [56]. In Biopsien von Nierentransplantationspatienten wurde in einigen Proben nach CTLA-4-Ig-Behandlung, jedoch nicht nach einer Therapie mit Calcineurininhibitoren, ein erhöhtes *IL17*-Expressionslevel festgestellt [243]. Kein Unterschied war dagegen in der *IFNG*-Expression beider Gruppen zu verzeichnen [243]. Eine weitere Studie untersuchte den Einfluss einer CTLA-4-Ig-Therapie auf Knorpelgewebe von Patienten mit rheumatoider Arthritis, welches in immundefiziente Mäuse transplantiert wurde. Es konnte ein therapeutischer Effekt durch die Neutralisierung von IL-17 in CD3-reichen Proben, nicht aber durch eine CTLA-4-Ig-Behandlung festgestellt werden [244]. CTLA-4-Ig hemmt die IL-2 Sekretion [242] und IL-2 wiederum die  $T_H17$ -Differenzierung [245]. Dies könnte eine Erklärung für die durch CTLA-4-Ig verstärkte  $T_H17$ -Immunantwort sein.

#### **WANN KÖNNTE EINE ERHÖHTE CD44-EXPRESSION SICH VORTEILHAFT AUF DIE $T_H17$ -DIFFERENZIERUNG AUSWIRKEN?**

Obwohl eine geringere TZR-Dosis möglicherweise nicht grundsätzlich eine Voraussetzung für die  $T_H17$ -Differenzierung darstellt, könnte sie unter bestimmten Bedingungen einen Vorteil erbringen.  $T_H17$ -Zellen exprimieren sogenannte *homing*-Rezeptoren für Haut und dem Darm [246]. Wie unter 2.1.4 dargestellt, ist diese  $T_H$ -Population sehr plastisch und eher zu frühen Zeitpunkten einer immunologischen Antwort zu finden, die oftmals in eine  $T_H1$ -Antwort übergeht [14, 247]. Die Differenzierung zu  $T_H17$ -Zellen bei einer geringen Antigendosis könnte für die Initiierung bestimmter Immunantworten biologisch relevant werden.

Dennoch sind auch andere Mechanismen denkbar, in denen sich eine erhöhte CD44-Expression vorteilhaft auswirkt. Die Haut enthält einen hohen Anteil des körpereigenen Hyaluronan [230, 248]. Da CD44 Adhäsion zur EZM vermitteln kann, könnte eine erhöhte Expression die Auswanderung von T<sub>H</sub>17-Zellen erleichtern und deren Persistenz in der Peripherie fördern. Gedächtnis-T<sub>H</sub>17-Zellen, die in der Peripherie verbleiben und HA binden, könnten einen Vorteil bei erneuter Aktivierung haben. Ebenso könnte die Bindung weiterer Komponenten der EZM bedeutsam für die T<sub>H</sub>17-Differenzierung sein. Wie unter 3.1.3 beschrieben bindet CD44 an MMP-9, welches TGF- $\beta$  in seine aktive Form spalten kann [204, 205]. Eine erhöhte TGF- $\beta$ -Konzentration in einer inflammatorischen Umgebung könnte daraufhin die T<sub>H</sub>17-Differenzierung fördern.

Des Weiteren kann CD44 auch über andere Mechanismen die Signalstärke erhöhen, wie beispielsweise über einen verlängerten Kontakt zwischen T-Zelle und dendritischer Zelle. Damit würde die Eigenschaft als Adhäsionsprotein stärker zum Tragen kommen.

### 3.3.4 AUSBLICK

Die derzeitigen Beobachtungen zeigen, dass eine erhöhte CD44-Oberflächenexpression alloreaktive T<sub>H</sub>17-Zellen charakterisiert und durch seine Wirkung als kostimulatorisches Molekül einen Vorteil unter bestimmten Stimulationsbedingungen schaffen könnte. Eine interessante Frage, die in diesem Zusammenhang untersucht werden könnte ist, ob eine Vernetzung von CD44 durch HA zu einer verstärkten T<sub>H</sub>17-Differenzierung führt.

Wie oben angedeutet, könnte eine erhöhte CD44-Expression aber auch wichtig bei der Auswanderung und Migration von CD4<sup>+</sup> T-Zellen sein. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, das Migrationsverhalten der CD44<sup>+++</sup> und CD44<sup>++</sup> Populationen vergleichend zu untersuchen und der Frage nachzugehen, ob CD44<sup>+++</sup> T<sub>H</sub>-Zellen eher in Organen wie Haut, Lunge und Darm akkumulieren.

Ebenso stellt sich die Frage, ob die erhöhte CD44-Expression auf T<sub>H</sub>17-Zellen bei der zweiten Stimulation zu einem verlängerten Kontakt zu Antigen-präsentierenden Zellen führen könnte und damit die Effektorfunktionen positiv beeinflusst. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Zellen mit einer verstärkten HA-Bindung die stärkste Proliferationsrate aufwiesen [249].

Die Daten des zweiten Teils dieser Arbeit zeigen, dass neben einem polarisierenden Zytokinmilieu weitere Faktoren für die Differenzierung zu verschiedenen T<sub>H</sub>-Zellpopulationen entscheidend sein können. Die Bedeutung dieser Faktoren wird angesichts der Komplikationen bei der Blockierung der Kostimulation durch Belatacept deutlich. Wie oben beschrieben führte die Verabreichung möglicherweise zu einer Modulation der T<sub>H</sub>-Zellantwort, welche Komplikationen, wie eine erhöhte Rate akuter Abstoßungsepisoden, nach sich ziehen könnte. Dies unterstreicht die Bedeutung der einzelnen T<sub>H</sub>-Zellpopulationen während einer Immunantwort und die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen zu ihrer Aktivierung und Differenzierung.



## 4 MATERIAL

### 4.1 ANTIKÖRPER\*

Antigen	Klon	Fluorochrom	Verdünnung	Hersteller
–	Streptavidin	PerCP	1:200	Biolegend, San Diego, USA
CD11c	N418	APC	1:200	Biolegend, San Diego, USA
CD19	6D5	PerCP	1:100	Biolegend, San Diego, USA
CD25	PC61	APCCy7	1:50	Biolegend, San Diego, USA
CD28	37.51	–	**	ebioscience, San Diego, USA
CD3	17A2	PB, PerCP,	1:100	Biolegend, San Diego, USA
CD3	145-2C11	–	**	ebioscience, San Diego, USA
CD4	RM4-5	PE, AF700	1:100	Biolegend, San Diego, USA
CD44	IM7	AF700, PECy7	1:100	Biolegend, San Diego, USA
CD44	IM7	unmarkiert	10 µg/ml	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
CD45 (pan)	30-F11	PE	1:100	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
CD45RB	C363-16A	PE	1:100	Biolegend, San Diego, USA
CD62L	MEL-14	APC	1:100	Biolegend, San Diego, USA
CD8	53-6.7	PerCP, PECy7	1:50	Biolegend, San Diego, USA
CD86	GL-1	Biotin	1:200	Biolegend, San Diego, USA
Fc-Block	24G2	–	5 µg/ml	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
IFN-γ	XMG1.2	APC	1:600	Biolegend, San Diego, USA
IFN-γ	XMG1.2	unmarkiert	10 µg/ml	DRFZ, Berlin, Deutschland
IL-17	ebio17E7	FITC, PE	1:400	ebioscience, San Diego, USA
IL-4	11B11	unmarkiert	10 µg/ml	DRFZ, Berlin, Deutschland
MHC II	M5/114.15.2	PE	1:2000	ebioscience, San Diego, USA
TNF-α	MP6-XT22	PECy7	1:600	Biolegend, San Diego, USA
ZAP-70/Y319	17A/P-ZAP70	PE	5 µl/Probe	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
αHamster IgG	Cocktail	Biotin	**	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland

\* Wenn nicht anders angegeben sind alle Antikörper gegen murine Antigene gerichtet.

\*\* siehe Angabe im entsprechenden Abschnitt

### 4.2 CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN

Bezeichnung	Hersteller
[α- <sup>32</sup> P]-dCTP (Desoxycytidintriphosphat); 3000 Ci/mmol, 50 µCi	Perkin-Elmer Applied Biosystems, Rodgau-Jügesheim, Deutschland
0,4 %ige Trypanblau-Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
1 kb DNA Ladder	Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA
Agar	Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA
Agarose	Serva Elektrophoresis, Heidelberg, Deutschland
Ampicillin	Calbiochem Merck, Darmstadt, Deutschland
Atipamezol (Handelsname: Antisedan)	Orion Corporation, Espoo, Finnland
Bepanthen Augen- und Nasensalbe	Bayer Health Care, Leverkusen, Deutschland
Carprofen (Handelsname: Rimadyl)	Pfizer GmbH, Berlin, Deutschland
Cell proliferation dye eFluor 450	ebioscience, San Diego, USA
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

dNTPs	Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA
Essigsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fixable Viability dye eFluor 506	ebioscience, San Diego, USA
Forene (100 %)	Abbott GmnH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland
Formaldehydlösung (36,5 %)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Gelatine (2 %)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glycerol	Serva Elektrophoresis, Heidelberg, Deutschland
Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Indo-1	Life technologies, Carlsbad, USA
KCl	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ketamin, 10 %	Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte, Garbsen, Deutschland
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
MitoTracker CMSRos	Life technologies, Carlsbad, USA
NaCl	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumpyruvat (100-fach: 100 mM)	Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA
Probenicid	Santa Cruz, Dallas, USA
ProLong Gold antifade reagent with DAPI	Life technologies, Carlsbad, USA
Titriplex III	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trypsin/EDTA (10-fach: 0,5 % Trypsin; 5,3 mM EDTA)	Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA
Trypton	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylazin, 2 % (Handelsname: Rompun)	Bayer Health Care, Leverkusen, Deutschland

### 4.3 ENZYME UND ZELLEN

Bezeichnung	Hersteller
Ascl	New England Biolabs, Ipswich, USA
AsiSI	New England Biolabs, Ipswich, USA
CIP (alkalische Phosphatase)	NEB, Frankfurt, Deutschland
DreamTaq™ Green DNA Polymerase	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
EcoR1	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Embryonale Fütterzellen (EF-Zellen)	Bereitgestellt von AG Waisman, Mainz, Deutschland
Embryonale Stammzellen (ES-Zellen: V6.5)	Bereitgestellt von AG Waisman, Mainz, Deutschland
Polymerase (Easy-A High-Fidelity PCR Cloning Enzyme)	Stratagene, La Jolla, USA
Proteinase K	Roche, Basel, Schweiz
RNase	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
T4-Ligase	New England Biolabs, Ipswich, USA
XL10-Gold ultrakompetente Zellen	Stratagene, La Jolla, USA

### 4.4 GERÄTE

Bezeichnung	Hersteller
Absaugpumpe mit Flasche	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Autoklav Serie EC	Webeco, Selmsdorf, Deutschland
Bakterienschüttler	Gallenkamp Sanyo, Moriguchi, Japan
BioMax Kassette	Caresteam Health, Rochester, USA
Brutschrank (Bakterien)	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Brutschrank IG150 (Zellkultur)	Jouan/ Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA

Computer: Esprimo E7936 E-Stars5 mit Windows 7	Fujitsu, Tokio, Japan
Computer: iMac11,2 mit Mac OS X 10.6.8	Apple, Cupertino, USA
Computer: Power Mac G5 mit OS X 10.4.11	Apple, Cupertino, USA
Durchflusszytometer: LSR II	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Durchflusszytometer: LSRFortessa	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Elektroporator: Gene Pulser Xcell	Bio-Rad, Hercules, USA
Geigerzähler	Berthold, Bad Wildbad, Deutschland
Gelkammer: Biostep	Biostep, Jahnsdorf, Deutschland
Gelkammer: Maxicell Primo	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Heizblock: Neoblock1 2-2503	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Heizblock: Mixingblock MB-102	Bioer Technology, Hangzhou, China
Mikrowelle LG Grill	LG electronics, Seoul, Südkorea
Mikroskop Nikon TMS	Nikon, Tokio, Japan
Isopropanol-Kryobox: Nalgene Cryo 1°C	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr, Bulle, Schweiz
Laborwaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Nanodrop	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Neubauer Zählkammer ( <i>improved</i> )	LO Laboroptic, Lancing, Großbritannien
PCR-Maschine: DNA Thermalcycler	Perkin-Elmer Applied Biosystems, Rodgau-Jügesheim, Deutschland
PCR-Maschine: GeneAmp PCR System 2400	Perkin-Elmer Applied Biosystems, Rodgau-Jügesheim, Deutschland
PCR-Maschine: Detektor 7700 von TaqMan™	Perkin-Elmer Applied Biosystems, Rodgau-Jügesheim, Deutschland
PCR-Maschine: Peqstar 96 Universal	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Pipettboy	Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Power Supply Consort E835	Consort, Turnhout, Belgien
Sterilbank: Antares	Biohit, Rosbach, Deutschland
Sterilbank: NuAire 44-400E	Zapf Instrumente/Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Durchflusszytometer: FACSCalibur	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
UV-Illuminator	DC Decon Science Tec, Hohengandern, Deutschland
Vortex-2 gene	Scientific industries/Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wasserbad: Typ 1003	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge: 5810R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge: Cytospin	Shandon/Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge: Multifuge 1 L	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge: Multifuge 1 L-R	Heraeus, Hanau, Deutschland

## 4.5 GRUNDLÖSUNGEN, PUFFER, MEDIEN UND DEREN ZUSÄTZE

### 4.5.1 GRUNDLÖSUNGEN

Bezeichnung	Hersteller
0,9% NaCl	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
Ampuwa	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
DMEM (+ Glc, – L-Gln, – Pyr)	Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA
DMEM Glutamax (+ Glc, + L-Gln)	Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA
HBSS (+ Ca <sup>2+</sup> , + Mg <sup>2+</sup> )	Lonza, Basel, Schweiz
HBSS (– Ca <sup>2+</sup> , – Mg <sup>2+</sup> )	Lonza, Basel, Schweiz
PBS (– Ca <sup>2+</sup> , – Mg <sup>2+</sup> )	Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA
RPMI 1640	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
ESGRO-2i Medium	Merck Millipore, Billerica, USA

#### 4.5.2 REZEPTUREN FÜR PUFFER UND MEDIEN

Bezeichnung	Zusammensetzung
(Prä-) Hybridisierungspuffer	0,5 M Natriumphosphatpuffer pH 7,2, 7% SDS, 10 mM EDTA
2-fach Einfriermedium	20 ml Fütterzell- oder Stammzell-Medium, 20 ml FCS-EF oder FCS-ES, 10 ml DMSO
20-fach SSC-Puffer	3 M NaCl, 300 mM Natriumcitrat, einstellen auf pH 7
Agarplatten	1,5 g Agar/ 100 ml LB-Medium, ggf. 100 mg/ml Ampicillin und 50 mg/ml X-Gal
BMDC-Einfriermedium	FCS-BMDC, 10 % DMSO, 60 ng/ml GM-CSF
BMDC-Medium	459 ml RPMI, 50 ml FCS-BMDCs, 5 ml Penicillin/ Streptomycin (100 U/ ml)
Denaturierungspuffer (Gel)	0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl
Denaturierungspuffer (Membran)	0,4 M NaOH
Depurinierungspuffer (Gel)	0,25 M HCl
ES-Zellmedium	500 ml DMEM, 90 ml FCS-A15-080 (15 %), 6 ml L-Glutamin (2 mM), 6 ml Nichtessenzielle Aminosäuren (0,1 mM), 6 ml Natriumpyruvat (1 mM), 6 ml Penicillin/Streptomycin (100 U/ ml), LIF (je nach Aktivität), 600 µl $\beta$ -Mercaptoethanol (0,1 mM)
EF-Zellmedium	500 ml DMEM Glutamax, 60 ml FCS-SG115 (10 %), 6 ml Nichtessenzielle Aminosäuren (0,1 mM), 6 ml Natriumpyruvat (1 mM), 6 ml Penicillin/Streptomycin (100 U/ ml)
Inaktivierungsmedium	200 ml Fütterzell-Medium, 2 mg (10 µg/ml) Mitomycin C
Kokulturmedium/ T-Zell-Medium	450 ml RPMI, 50 ml FCS-TZ, 5 ml Penicillin/ Streptomycin (100 U/ ml), 50 µM $\beta$ -Mercaptoethanol
LB-Medium	50 g Trypton, 25 g Hefeextrakt, 50 g NaCl, ad 5 l mit H <sub>2</sub> O danach autoklavieren
Lysepuffer (Southern Blot)	20 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 10 mM EDTA pH 8,0, 0,5 % Sarcosyl
Neutralisierungspuffer (Gel)	1,5 M NaCl, 1 M Tris/HCl pH 7,2
Neutralisierungspuffer (Membran)	0,2 M Tris/HCl pH 7,5, 1x SSC-Puffer
Selektionsmedium	600 ml ES-Zellmedium, 2,4 ml Geneticin (200 µg/ml)
Waschpuffer I	2-fach SSC Puffer, 0,1 % SDS
Waschpuffer II	0,2-fach SSC Puffer, 0,1 % SDS
Waschpuffer III	0,1-fach SSC Puffer, 0,1 % SDS
Zelllademedium	HBSS (–Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> ), 1 % FCS

#### 4.5.3 ZUSÄTZE FÜR ZELLKULTURMEDIEN

Bezeichnung	Hersteller
DMSO (Primärzellkultur)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DMSO (Stammzellkultur)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fötales Kälberserum für BMDCs (FCS-BMDCs) (Superior)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Fötales Kälberserum für EF-Zellen (FCS-EF)(Lot-Nr. SG115)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Fötales Kälberserum für ES-Zellen (FCS-ES) (Lot-Nr. A15-080)	PAA, Pasching, Österreich
Fötales Kälberserum für T-Zellen (FCS-TZ) (Lot-Nr. 344x)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Geneticin (G418), 50 mg/ml	Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA
HEPES (1M)	Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA
Hühner Serum	Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA
L-Glutamin (100-fach: 200 mM)	Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA
Mitomycin C (MMC)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA



Nichtessenzielle Aminosäuren (100-fach: 10 mM)	Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA
Penicillin/Streptomycin (P/S), je 10 000 U/ml	Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

#### 4.6 KITS

Bezeichnung	Hersteller
AnnexinV-PE: Apoptose Detektionskit	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
CD4 <sup>+</sup> T-Cell Isolation Kit II	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach Deutschland
Cytofix/Cytoperm™ Fixierungs- und Permeabilisierungs Kit	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
EasySep Mouse B Cell Enrichment Kit	Stemcell Technologies, Vancouver, Kanada
EasySep Mouse CD8 <sup>+</sup> T Cell Enrichment Kit	Stemcell Technologies, Vancouver, Kanada
Human and Mouse Pluripotent Stem Cell Analysis Kit	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
JETQUICK Gel Extraction Spin Kit	Genomed, Löhne, Deutschland
JETSTAR 2.0 Plasmid Maxi Kit	Genomed, Löhne, Deutschland
JETSTAR 2.0 Plasmid Mini Kit	Genomed, Löhne, Deutschland
Ladderman Labeling Kit	Takara Bio Inc., Otsu Shiga, Japan
Large Construct Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Mouse FlowCytomix Basic Kit	ebioscience, San Diego, USA
Mouse IFN-γ FlowCytomix Simplex	ebioscience, San Diego, USA
Mouse IL-10 FlowCytomix Simplex	ebioscience, San Diego, USA
Mouse IL-17A FlowCytomix Simplex	ebioscience, San Diego, USA
Mouse IL-2 FlowCytomix Simplex	ebioscience, San Diego, USA
Mouse IL-4 FlowCytomix Simplex	ebioscience, San Diego, USA
Mouse Pluripotent Stem Cell Analysis Kit	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Mouse TNF-α FlowCytomix Simplex	ebioscience, San Diego, USA
PCR Cloning Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Permeabilisierung- und Waschpuffer (10-fach)	Biolegend, San Diego, USA
NucleoSpin RNA II Kit	Machery-Nagel, Düren, Deutschland
QuantiTect reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
TaqMan 2-fach Universal PCR Master Mix	PerkinElmer Applied Biosystems, Rodgau-Jügesheim, Deutschland
Treg Detection Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

#### 4.7 MAUSSTÄMME

Stamm	Hintergrund	Herkunft
BALB/c	Inzucht	Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland
C57BL/6	Inzucht	Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland
<i>Cd4-Cre</i>	C57BL/6(129sv)	Eigenzucht
<i>Rag-1</i> KO	C57BL/6	Eigenzucht

## 4.8 SEQUENZEN UND PLASMIDE

Die Sequenz des *Tcaim*-Leserahmens befindet sich im Anhang (8.1).

### 4.8.1 PRIMER ZUR TYPISIERUNG UND KLONIERUNG

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
CreFS1	ACGACCAAGTGACAGCAATG
CreFS2	CTCGACCAGTTTAGTTACCC
pRosa_Asc rev	GGCGCGCCTTACTTCATGGCTTCT
R26FA	AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT
R26RA	GGAGCGGGAGAAATGGATATG
SpliceAB	CATCAAGGAAACCCTGGACTACTG
Toagint2-fw	AATCCGGGGCCACTTCAGAATGT
pRosa_Asc fw	GGCGCGCCATGTTTGGCCACT

### 4.8.2 OLIGONUKLEOTIDE FÜR DIE QUANTITATIVE ECHTZEIT-PCR

Art	Gen	Sequenz (5'→3')	Konzentration
Primer	<i>Tcaim</i>	CCTTCTACAACCAGCTGCTGAGA	900 nM
Primer	<i>Tcaim</i>	AATGCCCAGTTCATGCAAG	900 nM
Sonde	<i>Tcaim</i>	TGATCCTTAGCAGTGACAGGTATGCGCC	100 µM
Primer	<i>Hprt</i>	ATCATTATGCCGAGGATTTGGAA	900 nM
Primer	<i>Hprt</i>	TTGAGCACACAGAGGGCCA	300 nM
Sonde	<i>Hprt</i>	TGGACAGGACTGAAAGACTTGCTCGAGATG	100 µM
Primer	<i>TNF</i> -Intron	TCAGCAGCTACCCACACTTCACT	300 nM
Primer	<i>TNF</i> -Intron	TCAGCAGCTACCCACACTTCACT	300 nM
Sonde	<i>TNF</i> -Intron	CACCCGGGACCTCATAGCCAATGG	100 µM

### 4.8.3 PLASMIDE UND SOUTHERN BLOT SONDE

Bezeichnung	Herkunft
pDrive	Bestandteil des PCR Cloning Kits, Qiagen, Hilden, Deutschland
pGK-Cre	zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Waisman, Institut für Molekulare Medizin, Johannes Gutenberg-Universität Mainz
pR26	zur Verfügung gestellt von Dr. Wunderlich, Institut für Genetik, Universität Köln
Southern Blot Sonde	zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Waisman, Institut für Molekulare Medizin, Johannes Gutenberg-Universität Mainz [siehe auch 125]

## 4.9 SOFTWARE

Bezeichnung	Hersteller
7500 System SDS Software V1.4.0	Perkin-Elmer Applied Biosystems, Rodgau-Jügesheim, Deutschland
Adobe Creative Suite 6	Adobe, San Jose, USA
BD CellQuest	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
BD FACSDiva	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
FlowCytomix Pro Software V2.4	Bender Medsystem, Wien, Österreich
Flowjo V9	Treestar, Ashland, USA
Gene Construction Kit V3	Texto BioSoftware Inc., West Lebanon, USA
GraphPad PRISM V6	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA

## 4.10 WEITERE VERBRAUCHSMATERIALIEN

Bezeichnung	Hersteller
Bakterienschalen (10 cm)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Einwegpipetten	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Einwegrasierer: Wilkinson Typ 182 H	Wilkinson Sword GmbH, Solingen, Deutschland
Elektroporationsküvette (0,4 cm Spalt)	Bio-Rad, Hercules, USA
Eppendorf Gefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Illustra MikroSpin G-50 Columns	GE Healthcare, Fairfield, USA
Kanülen: 26 G ½, 0,45 × 13 mm	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Kanülen: 27 G ¾, 0,4 × 19 mm	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Lochplatten (96-Loch, flach)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Lochplatten (außer 96-Loch, flach)	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Lochplatten (unbeschichtet)	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Mullbinde, selbsthaftend, Ypsiflex haft 8 × 20 cm	Holthaus, Medical GmbH, Remscheid, Deutschland
Mullkompressen: Gazin, 10x10 cm; REF 13 697	Lohmann & Rauscher International GmbH und Co. KG, Rengsdorf, Deutschland
Nitrozellulosemembran: Hybond-N+	GE Healthcare, Fairfield, USA
Parafilm	Serva Elektrophoresis, Heidelberg, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Röntgenfilm: BioMax MS Film	Carestream Health, Rochester, USA
Rundbodengefäße (1,4 ml)	Micronic, Lelystad, Niederlande
Rundbodengefäße (14 ml)	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Rundbodengefäße (5 ml Polystyrene)	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Rundkörper-Nadel, schneidend (Prolene 5-0, V-5, Bogenlänge 17,0 mm)	Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland
Salbentüll: Lomatuell H	Lohmann & Rauscher GmbH und Co. KG, Neuwied, Deutschland
Skalpelli: Feather Disposable Scalpel Nr. 10/20	Medizin AG, Köln, Deutschland
Spritzen (1 ml)	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Spritzen (10 ml)	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Surgical Skin Marker Securline®	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Verbandstoff: Tegaderm Roll	3M Health Care, Neuss, Deutschland
Whatmanpapier 3mm	Whatman/ GE Healthcare, Fairfield, USA
Zellkulturschalen (10 cm)	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Zellsiebe (100 µm, 40 µm)	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland

## 4.11 ZYTOKINE, STIMULANTIEN UND INHIBITOREN

### 4.11.1 ZYTOKINE

Zytokin	Spezies	Konzentration	Hersteller
CTLA-4-Ig	murin	1 µg/ml	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
GM-CSF	murin	6 ng/ml	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach Deutschland
IL-12	murin	10 ng/ml	Peprotech, Hamburg, Deutschland oder R&D Systems, Minneapolis, USA
IL-23	murin	10 ng/ml	Peprotech, Hamburg, Deutschland
IL-6	murin	20 ng/ml	Peprotech, Hamburg, Deutschland
TGF-β	human	1 ng/ml	R&D Systems, Minneapolis, USA

#### 4.11.2 STIMULANTIEN UND INHIBITOREN

Bezeichnung	Hersteller
Brefeldin A	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Colcemid	Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA
Ionomycin	Biotrend Chemikalien, Köln, Deutschland
LIF (Mediumüberstand von HEK-Zellen mit LIF-Plasmid)	Eigenproduktion, bereitgestellt von Dr. Simone Wörtge, Mainz, Deutschland
LPS (0127:B8)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PMA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Brefeldin A	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

## 5 METHODEN

### 5.1 HERSTELLUNG DES ZIELVEKTORS *PR26-TCAIM*

Um die genetische Veränderung des *R26* Locus in ES-Zellen zu etablieren, wurde der *Tcaim*-Leserahmen (Sequenz siehe 7.2) in einen Zielvektor (*pR26*) kloniert.

#### 5.1.1 Klonierung des *TCAIM*-LESERAHMENS IN *pDRIVE*

Zunächst wurde der Leserahmen von *Tcaim* amplifiziert (Sequenz siehe 8.1). Die Enden des Fragments wurden durch Sequenzen innerhalb der Primer so verändert, dass sowohl das 5'-Ende als auch das 3'-Ende eine *Ascl*-Schnittstelle aufwies, was die spätere Insertion in den Zielvektor *pR26* ermöglichte. Zuerst erfolgte allerdings eine Subklonierung dieses Leserahmens in den Vorvektor *pDrive*. Als Matrize für die Amplifikation diente ein Vektor, der den *Tcaim*-Leserahmen enthielt. Die Amplifikation erfolgte und folgenden Bedingungen:

##### Reaktionsansatz:

dNTPs (2.5mM je dNTP)	1,0 µl
dATP	1,0 µl
Primer ( <i>pROSA_Asc_fw</i> )	1,0 µl
Primer ( <i>pROSA_Asc_rev</i> )	1,0 µl
10-fach Puffer	5,0 µl
Polymerase (Easy A)	0,125 µl
H <sub>2</sub> O	39,5 µl
Matrize	10 ng

##### PCR-Programm:

(GeneAmp PCR System 2400):

95 °C	2 min	
95 °C	40 s	
59 °C	30 s	37 Zyklen
72 °C	90 s	
72 °C	7 min	
4 °C	∞	

Die Überprüfung der Größe des entstehenden Fragments erfolgte durch die Elektrophorese im 1 %igen Agarosegel. Anschließend wurde das Produkt unter Verwendung des *PCR Cloning-Kits* mit dem Vektor *pDrive* ligiert.

##### Reaktionsansatz (Inkubation für 2 h bei 14 °C):

pDrive	1,0 µl
PCR-Produkt	2,0 µl
2-fach Puffer	5,0 µl
DNA	10 ng

Das Ligationsprodukt wurde mittels Hitzeschock in kompetente *E.coli* (Stamm: DH5α) transformiert.

#### 5.1.2 HERSTELLUNG KOMPETENTER BAKTERIEN

5 ml LB-Medium wurden mit *E.coli* DH5α angeimpft und über Nacht (ÜN) bei 220 rpm und 37 °C geschüttelt. Am folgenden Tag wurden 100 µl Bakteriensuspension der ÜN-Kultur in 100 ml frisches LB-Medium überimpft und bis zu einer optischen Dichte von OD<sub>600</sub> = 0,6 geschüttelt (200 rpm; 37 °C). Die Suspension wurde in zwei Gefäße (50 ml) überführt, für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 10 ml eiskalter CaCl<sub>2</sub>-Lösung (0,05-0,1 M)

resuspendiert und für 5 min inkubiert. Anschließend wurde die Suspension pelletiert (10 min, 4000 rpm), der Überstand verworfen, das Pellet in 2 ml CaCl<sub>2</sub> mit 10 % Glycerol aufgenommen, zu je 100 µl aliquotiert und bei -80 °C weggefroren.

### 5.1.3 TRANSFORMATION DURCH HITZESCHOCK

0,1-1 µg Ligationsprodukt und 100 µl kompetente Bakterien (*E.coli* DH5α) wurden vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch 30-45 s bei 42 °C inkubiert. Nach dem Hitzeschock wurde 1 ml vorgewärmtes LB Medium (ohne Antibiotika) zugegeben und für eine Stunde geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde in verschiedenen Konzentrationen auf ampicillinhaltige Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 5.1.4 KOLONIE-PCR

Bakterienkolonien wurden gepickt und in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin geschüttelt (6-9 h; 200 rpm; 37 °C). Ob die Bakterien das Fragment trugen, wurde mittels Kolonie-PCR überprüft:

#### Reaktionsansatz:

dNTPs (2.5mM je dNTP)	1,0 µl
Primer (pROSA_Asc_fw)	1,0 µl
Primer (pROSA_Asc_rev)	1,0 µl
10-fach Puffer	2,5 µl
Polymerase	0,1 µl
Bakteriensuspension	2,0 µl
H <sub>2</sub> O	ad 25 µl

#### PCR-Programm:

(GeneAmp PCR System 2400)

95 °C	2 min	
95 °C	40 s	
59 °C	30 s	37
72 °C	90 s	Zyklen
72 °C	7 min	
4 °C	∞	

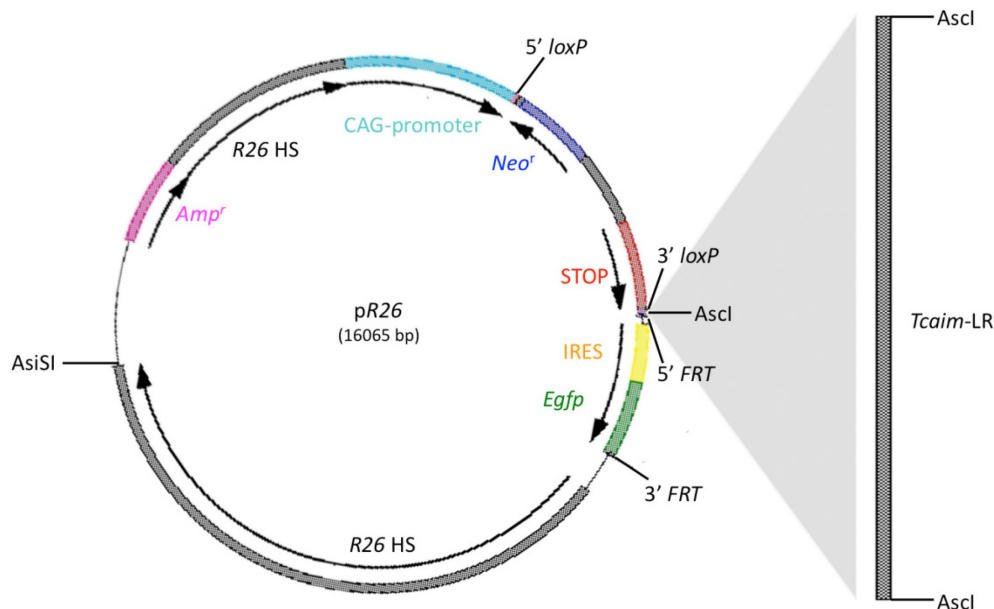
Konnte das *Tcaim*-AscI Fragment detektiert werden (etwa 1500 bp), wurden die angeimpften Kulturen ÜN bei 37 °C geschüttelt und die DNA durch eine Plasmidaufreinigung mittels *JETSTAR 2.0 Plasmid Mini Kit* im kleinen Maßstab isoliert. Anschließend wurde die DNA durch die Firma MWG Eurofins Operon sequenziert, bei korrekten Sequenzierungsergebnissen im großen Maßstab vermehrt und mittels *JETSTAR 2.0 Plasmid Maxi Kit* aufgereinigt. Der Einbau des Leser Rahmens wurde nach der Aufreinigung stets durch einen Restriktionsverdau überprüft. Der entstandene Vorvektor wurde pDrive-*Tcaim*-Asc genannt.

### 5.1.5 KLONIERUNG DES *TCAIM*-LESERAHMENS IN *PR26*

Der Vektor *pR26* wurde durch Dr. Wunderlich (Universität Köln, Institut für Genetik) bereitgestellt. Abbildung 5-1 zeigt eine Vektorkarte des naiven Zielvektors und die Klonierungsstelle für den *Tcaim*-Leserahmen (LR). Der Vektor enthielt die folgenden genetischen Elemente:

- Ausgedehnte homologe Sequenzen zum *R26* Locus (*R26* HS) ermöglichten eine homologe Rekombination.

- Resistenzgene für Ampicillin (*Amp<sup>r</sup>*) und Geneticin/Neomycin (*Neo<sup>r</sup>*) erlaubte eine Selektion der transformierten Bakterien oder Stammzellen.
- Eine Sequenz zur transkriptionellen Terminierung (STOP) verhinderte die Transkription von *Tcaim*. Sie besteht aus drei aufeinanderfolgenden Polyadenylierungssequenzen.
- *loxP*-Stellen flankieren die *Neo<sup>r</sup>*-STOP-Kassette.
- Eine *Ascl* Restriktionsstelle ermöglichte die Insertion des *Tcaim*-Leserahmens (LR).
- Der Insertionsstelle folgen eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) und ein Leserahmen für *Egfp* (*enhanced green fluorescent protein*). Dies gestattete eine koordinierte Expression von *Tcaim* und *Egfp* durch eine gemeinsame mRNA.
- *FRT*-Stellen flankieren die IRES-*Egfp* Sequenz und erlauben eine Flippase-vermittelte Rekombination, was zu einer Exzision von IRES-*Egfp* führen würde.
- Die Expression des Transgens und *Egfp* wurde durch den CAG-Promoter (*chicken/actin/globulin*) initiiert.
- Die *AsiSI*-Restriktionsstelle ermöglichte die Linearisierung des Vektors vor der Elektroporation.



**Abbildung 5- 1. Vektorkarte von pR26.** Der Vektor enthält die folgenden genetischen Elemente: ausgedehnte zum *R26* Locus homologe Bereiche (*R26 HS*), Resistenzgene für Ampicillin (*Amp<sup>r</sup>*) und Geneticin (*Neo<sup>r</sup>*), einen Promoter (CAG), einen transkriptionellen Terminator (STOP), eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES), einen Leserahmen für *Egfp*, *loxP*- und *FRT*-Sequenzen sowie Restriktionsstellen für die Enzyme *AsiSI* und *Ascl*. Dargestellt ist die Insertionsstelle für den *Tcaim*-Leserahmen.

Die Vektor-DNA wurde durch die Transformation in *E.coli XL Gold* gemäß Herstellerangaben vermehrt und durch die DNA durch eine Plasmidaufreinigung im großen Maßstab mittels *Large Construct Kit* gemäß Herstellerangaben isoliert.

Der Vorvektor pDrive-*Tcaim* wurde mit dem Restriktionsenzym *Ascl* verdaut. Ebenso wurde der Zielvektor mit dem Restriktionsenzym *Ascl* verdaut, danach gefällt (Protokoll siehe 5.1.5) und wie folgt dephosphoryliert:

CIP-Vormix:

NEB Puffer 3	1,4 µl
CIP	1,0 µl
H <sub>2</sub> O	11,6 µl

Reaktionsansatz

DNA	Je nach Menge
NEB Puffer 3	15 µl
CIP-Vormix	30 s
H <sub>2</sub> O	ad 100 µl

Sowohl Zielvektor als auch *Tcaim*-PCR-Fragment wurden anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen und mittels Gelextraktion aufgereinigt (gemäß Herstellerangaben mittels *JETQUICK Gel Extraction Spin Kit*). Die isolierte DNA wurde ein weiteres Mal gefällt und anschließend nach folgendem Protokoll ligiert.

Reaktionsansatz:

T4-Ligase	1,0 µl
10-fach T4 Ligase-Puffer	2,0 µl
<i>Tcaim</i> -Asc-Fragment	unterschiedliche Mengen
Linearisierter pR26 Vektor	unterschiedliche Mengen
H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

Die Vektor- und Insert-DNA sollte in etwa äquimolaren Mengen in den Ligationsansatz gegeben werden. Ligiert wurde für 2 h bei 17 °C und anschließend bei 65 °C 10 min inaktiviert. Das Ligationsprodukt wurde gemäß Herstellerangaben in kompetente *E.coli XL Gold* transformiert und Zellklone wie bereits beschrieben ausplattiert und mittels Kolonie-PCR überprüft. Positive Klone wurden vermehrt, deren Plasmid-DNA mittels *Large Construct Kit* isoliert und aufgereinigt. Die DNA wurde durch die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) sequenziert und durch einen AsiSI-Verdau linearisiert.

**5.1.6 DNA-FÄLLUNG**

Die gelöste DNA wurde mit H<sub>2</sub>O auf 200 µl aufgefüllt. 20 µl 3 M Natriumacetat ( $\frac{1}{10}$  des Volumens und 550 µl 100 %iges Ethanol (2,5-faches Volumen) wurde zugegeben und gemischt. Die Fällung wurde ÜN bei –80 °C inkubiert und anschließend 90 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Präzipitat mit 200 µl 100 %igem Ethanol gewaschen (15 min; 13000 rpm). Anschließend wurde der Überstand abgenommen. Sobald das Präzipitat getrocknet war, konnte es wieder in Wasser gelöst werden.

**5.2 HERSTELLUNG UND INJEKTION *TCAIM*-TRANSGENER STAMMZELLEN**

*Vorgehensweise:* Zur Herstellung *Tcaim*-transgener ES-Zellen wurden zunächst embryonale Fütterzellen (EF-Zellen) kultiviert und durch eine Mitomycin C-Behandlung in der Mitose arretiert. Sie konnten anschließend als Basis für die ES-Zellkultur dienen. Das durch AsiSI-linearisierte pR26-*Tcaim* Plasmid wurde schließlich in ES-Zellen elektroporiert. Nach 2 Tagen wurden die ES-Zellen durch die Zugabe von Antibiotikum selektioniert. Dies führte zum Absterben aller ES-Zellen, die nicht den Selektionsmarker des Vektorsystems (Neo<sup>r</sup>) trugen. Nach 8-10 Tagen ließen sich einzelne Zellkolonien auf der Platte ernten. Der korrekte Einbau des Vektors wurde anschließend zweifach mittels Southern Blot (siehe 5.3) überprüft. Die



Funktionalität der ES-Zellklone wurde darüber hinaus noch durch die Elektroporation eines *Cre*-exprimierenden Plasmids überprüft (vgl. 2.2.1). Zusätzlich wurde der Karyotyp der ES-Zellen durch die Firma Chrombios ermittelt (vgl. 2.2.1). Im Folgenden sind detaillierte Protokolle für die beschriebenen Schritte aufgeführt.

### 5.2.1 AUFTAUEN VON EF-ZELLEN DER GENERATION 0

Tiefgefrorene EF-Zellen der Generation 0 (EF0-Zellen) wurden von Dr. Simone Wörtge bereitgestellt. Bis zur Nutzung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Ein Aliquot tiefgefrorener EF0-Zellen wurde im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, in 10 ml vorgewärmtes EF-Medium überführt und pelletiert (Raumtemperatur (RT); 4 min; 1000 rpm). Der Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet in 80 ml EF-Zellmedium resuspendiert und zu je 20 ml auf vier 15 cm Zellkulturschalen verteilt. Diese wurden bei 10 %iger CO<sub>2</sub>-Konzentration kultiviert und im Folgenden als erste Generation bezeichnet (EF1). Am Folgetag wurde das Medium in den Zellkulturschalen dekantiert und durch frisches ersetzt.

### 5.2.2 TRYPSINISIEREN UND EXPANSION DER EF-ZELLEN

Nach 3-5 Tagen war die Schale konfluent bewachsen, das Medium wurde dekantiert und die Zellschicht mit 10 ml PBS abgespült ohne die Zellen zu lösen. Der Vorgang wurde wiederholt und die Zellschicht anschließend mit 5 ml Trypsin für 4 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen jeder Platte wurden mit 10 ml Medium abgespült und anschließend pelletiert. Das vereinigte Pellet der 4 Platten wurde in 5 ml EF-Medium resuspendiert, auf 40 ml aufgefüllt und auf 4 Platten verteilt.

### 5.2.3 MITOMYCIN C-BEHANDLUNG VON EF-ZELLEN (=MEF-ZELLEN)

Um die EF-Zellen in der Mitose zu arretieren, wurden die Zellen für 2-4 h mit Mitomycin C (MMC)-haltigem Medium inkubiert. Anschließend wurden die Mitomycin C-behandelten EF-Zellen (MEF-Zellen) trypsinisiert, gezählt und bis zur Verwendung in flüssigem Stickstoff eingefroren.

### 5.2.4 EINFRIEREN VON (M)EF-ZELLEN

(M)EF-Zellen wurden in Aliquote zu jeweils  $4 \times 10^6$  Zellen eingefroren. Dazu wurden die Zellen mit der Hälfte des finalen Volumens aufgenommen, auf Eis gestellt und tropfenweise 2-fach Einfriermedium dazu pipettiert und gemischt. Aliquote zu 1 ml wurden in einer Isopropanol-Kryobox 24 h bei -80 °C und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren.

### 5.2.5 AUFTAUEN UND AUSPLATTIEREN VON (M)EF-ZELLEN

Ein Aliquot der (M)EF-Zellen wurde im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und in 10 ml vorgewärmtem EF-Medium verdünnt und pelletiert. Das Medium wurde dekantiert und die Zellen in 5 ml vorgewärmtem ES-Medium vereinzelt. Im Volumen von 10 ml wurden die Zellen auf 10 cm Zellkulturschalen ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 10 %iger CO<sub>2</sub>-Konzentration und 37 °C. Die Zellen konnten innerhalb der nächsten 8 Tage genutzt werden, frühestens jedoch nach 12 h.

### 5.2.6 AUFTAUEN VON ES-ZELLEN

Feuerpolierte Pipetten (FPP) wurden folgendermaßen vorbereitet: Die scharfen Kanten der Öffnung einer Glaspipette wurden im Feuer abgerundet und die Öffnung verkleinert. Die ES-Zellen wurden rasch angetaut und mit 7 ml vorgewärmtem Medium verdünnt. Anschließend wurden sie pelletiert (3 min, 1000 rpm, RT) und in 2 ml ES-Medium mit Hilfe einer FPP vereinzelt. Das Volumen wurde mit ES-Zellmedium auf 10 ml erhöht und gut gemischt. Das Medium der mit MEF-Zellen beschichteten Schale wurde dekantiert und durch die ES-Zellsuspension ersetzt. Das Medium wurde täglich gewechselt.

### 5.2.7 TRYPSIN-BEHANDLUNG VON ES-ZELLEN

2 h vor der Trypsinierung wurde das Medium vorsichtig abgezogen und durch frisches ersetzt. Wie für EF-Zellen beschrieben wurden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsinisiert und anschließend mit einer FPP vereinzelt. Die Reaktion wurde mit ES-Medium gestoppt und die Zellen pelletiert.  $3 \times 10^6$  ES-Zellen wurden auf eine 10 cm Schale mit MEF-Zellen ausplattiert. Eine konfluent mit ES-Zellen bewachsene 10 cm Schale wurde dabei auf 8-16 neue Zellkulturschalen aufgeteilt.

### 5.2.8 ELEKTROPORATION VON ES-ZELLEN

ES-Zellen wurden trypsinisiert und in einer Konzentration von  $1 \times 10^7$  Zellen pro 800 µl in PBS aufgenommen. 800 µl Zellsuspension wurden mit 25 µg linearisierter Vektor-DNA (ebenfalls in PBS gelöst) gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt und elektroporiert (Bedingungen: 24 V; 500 µF, Zeitkonstante zwischen 8-10). Die Suspension wurde 10 min auf Eis inkubiert und schließlich in 50 ml ES-Zellmedium aufgenommen. Die Suspension wurde zu gleichen Teilen auf 5 mit geneticinresistenten MEF-Zellen bewachsenen 10 cm Zellkulturschalen verteilt. Als Überlebenskontrolle wurden ebenfalls nicht-elektroporierte ES-Zellen ausplattiert (Kontrollplatte). Die Selektion erfolgte nach 48 h durch Ersetzen des Mediums mit geneticinhaltigem Medium.

### 5.2.9 PICKEN VON GENETICIN-RESISTENTEN ES-ZELLKOLONIEN

Nach einer Selektionszeit von 8-12 Tagen starben alle Zellen auf der Kontrollplatte, während sich auf den übrigen Platten Zellkolonien mit einem Durchmesser von 0,5-2 mm bildeten. Ein Tag vor dem Picken der Kolonien wurden auf 96-Lochplatten MEF-Zellen ausplattiert ( $4 \times 10^6$  Zellen pro 100 µl). Das Medium der elektroporierten ES-Zellen wurde am Folgetag 2 h vor dem Picken ausgetauscht und anschließend folgende Materialien steril vorbereitet: PBS, PBS versetzt mit Penicillin und Streptomycin (PBS/PS), ES-Zellmedium, Rundboden 96-Lochplatte mit je 50 µl Trypsin und PBS im Verhältnis 1:1, Mehrkanalpipette und zugehörige Spitzen. Alle Medien und Puffer wurden vorgewärmt.

Die Zellkulturschale mit den ES-Kolonien wurde zweimal mit PBS gewaschen und anschließend 8 ml PBS/PS zugegeben. Jede Kolonie wurde durch leichtes Zerstoßen des EF-Zellrasens in 50 µl aufgesaugt und in ein mit PBS und Trypsin befülltes Loch gegeben. Eine Reihe oder Spalte wurde mit Kolonien gefüllt und diese anschließend mit einer Mehrkanalpipette vereinzelt. Nachdem die zweite Reihe gefüllt war, wurde die

Trypsinreaktion der ersten Reihe mit 100 µl Medium gestoppt. Ein Mediumswechsel erfolgte 5 h nach dem Picken der Zellkolonien.

#### 5.2.10 GELATINEBESCHICHTUNG VON ZELLKULTURPLATTEN

Gelatine wurde im Wasserbad auf 37 °C erwärmt und anschließend in PBS zu einer 0,1 %igen Lösung verdünnt. Eine 96-Lochplatte wurde mit 50-100 µl Gelatinelösung pro Loch für 30 min bei RT beschichtet. Die Gelatine wurde dekantiert und die Platte für 20 min getrocknet. ES-Zellkolonien wurden auf gelatinebeschichtete und auch auf mit EF-Zellen bewachsene Platten aufgeteilt. Aus den erstgenannten wurde DNA für den Southern Blot gewonnen, letztere dienten der Injektion. Eine dichtbewachsene Platte wurde auf 3 neue Platten aufgeteilt. Die Trypsinierung erfolgte wie bereits beschrieben (50 µl Trypsin pro 96-Loch). Zum Einfrieren wurde die Zellsuspension mit 2-fachem Einfriermedium vermischt, die Platten mit Parafilm abgedichtet und zunächst bei -20 °C aber nach 30-120 min bei -80 °C eingefroren.

#### 5.2.11 ELEKTROPORATION EINES CRE-EXPRESSIONSVEKTORS (pGK-CRE)

Die ES-Zellen wurden auf gelatinebeschichteten 6-Lochplatten (siehe 5.2.10) kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase trypsiniert. Ein Drittel der Zellen eines dichtbewachsenen Lochs wurde mit 10 µg pGK-Cre oder demselben Volumen an PBS gemischt und wie oben beschrieben elektroporiert. Die Zellen wurden auf ein neues gelatinebeschichtetes Gefäß einer 6-Lochplatte ausplattiert und nach 48 h geerntet. Ein Teil der Zellen wurde pelletiert und bei -20 °C bis zur RNA-Aufarbeitung gelagert. Der andere Teil wurde durchflusszytometrisch untersucht.

#### 5.2.12 VORBEREITUNG DER ES-ZELLEN ZUR KARYOTYPISIERUNG

Die ES-Zellen wurden auf gelatinebeschichteten 6-Lochplatten bis zur exponentiellen Wachstumsphase kultiviert. 0,2 µg/ml Colcemid wurde zugegeben und für 3 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen trypsiniert und pelletiert. Das Pellet wurde vorsichtig aufgelockert und tropfenweise KCl (75 mM) unter leichtem Schütteln zugegeben. Nach einer Inkubation von 10 min bei RT wurden die Zellen erneut pelletiert (1100 rpm, 10 min). Der Überstand wurde bis auf 0,5 ml abgenommen und die Zellen vorsichtig durch Schütteln resuspendiert. 3 ml eines vorbereiteten Fixativs (Methanol/Essigsäure 3:1) wurden vorsichtig tropfenweise zugegeben. Das Volumen wurde auf 15 ml mit Fixativ erhöht und für 30 min bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (1500 rpm 10 min) und der Überstand bis auf 0,5 ml abgenommen. Die Zellen wurden erneut gelöst und zunächst 3 ml Fixativ zugegeben, bevor das Volumen auf 15 ml erhöht wurde. Es erfolgte eine Lagerung der Proben bei -20 °C (ÜN). Für den Versand wurden die Proben pelletiert und in 1 ml Fixativ aufgenommen [vgl. 250].

#### 5.2.13 INJEKTION DER ES-ZELLKLONE

Durch einen Southern Blot überprüfte ES-Zellklone wurden ausgehend von den Replikplatten vermehrt und zu je  $5 \times 10^6$  Zellen pro Aliquot wie für EF-Zellen beschrieben eingefroren. Zur Injektion wurden vier 10 cm Schalen mit MEF-Zellen vorbereitet. Ein Aliquot eines ES-Zellklons wurde aufgetaut (s.o.) und auf eine Schale mit MEF-Zellen

ausplattiert. Etwa 3 Tage später sollte die Platte dicht mit Kolonien bewachsen sein und es erfolgte ein weiterer Vermehrungsschritt. Hierzu wurden die Zellen trypsiniert (s.o.) und auf 3 mit MEF-Zellen bewachsene Schalen verteilt. 3 Tage später erfolgte die Injektion. Hierzu wurde eine Schale mit ES-Zellen trypsiniert und die Zellsuspension zum Absetzen der MEF-Zellen zweimal für 15-20 min auf in einer Zellkulturschale inkubiert. Anschließend wurden die ES-Zellen in 2-3 ml EF-Medium (ohne LIF) und 20 mM HEPES aufgenommen. Zellinjektionen wurden unter der Leitung von Dr. Kurt Reifenberg und Elena Wiese (ZVTE: Zentrale Versuchstiereinrichtung der Johannes Gutenberg Universität Mainz) durchgeführt. Das Prinzip soll kurz erläutert werden.

*Prinzip:* Zur Gewinnung von Blastozyten und 8-Zellstadien wurden C57BL/6 Weibchen werden durch die Verabreichung von Hormonen und anschließende Verpaarung zur Superovulation gebracht. Einige Tage später wurden die Blastozyten und 8-Zellstadien aus den Eileitern gespült und etwa 8-10 ES-Zellen injiziert. Diese präparierten Embryonen wurden anschließend in pseudoträchtige C57BL/6 Weibchen injiziert. Der Zustand wurde die durch die „Verpaarung“ mit vasktomierten Männchen hervorgerufen.

### 5.3 SOUTHERN BLOT

*Prinzip:* Durch einen Southern Blot werden DNA-Fragmente aus Zellen (hier: geneticin-selektionierte ES-Zellen), die zuvor spezifisch mit einem Restriktionsenzym geschnitten wurden (hier: EcoRI) verdaut und durch ein Agarosegel gemäß ihrer Größe aufgetrennt. Diese Fragmente werden auf eine Membran übertragen, immobilisiert und denaturiert. Anschließend lassen sich durch die Inkubation mit einer radioaktivmarkierten Sonde und anschließende Autoradiographie Fragmente spezifisch nachweisen. Für die Sonde wurde in diesem Experiment ein DNA-Bereich gewählt, der komplementär zum 5'-Ende des veränderten Locus ist [125].

*Detailliertes Protokoll:* Ein mit ES-Zellklonen dichtbewachsenes 96er-Loch wurde mit 40 µl Lysepuffer und 0,75 mg/ml Proteinase K versetzt. Die Platte wurde 12-18 h bei 56 °C schüttelnd inkubiert. Durch die Zugabe von 200 µl 100 %igem Ethanol für 1-2 h wurde die DNA bei RT präzipitiert. Die Flüssigkeit wurde abgeklopft, zweimal für jeweils 10 min mit 70 %igem Ethanol gewaschen und anschließend die DNA folgendermaßen verdaut:

Reaktionsansatz (Inkubation 12-24 h bei 37 °C):

EcoRI (100U/µl)	0,5 µl
RNase A (10 U/µl)	0,4 µl
10-fach EcoRI Puffer	4,0 µl
1 M DTT (1 M)	0,1 µl
Spermidin (1 M)	0,1 µl
H <sub>2</sub> O	34,5 µl

Der Verdau wurde am Folgetag durch Elektrophorese geprüft (0,8 %iges Agarosegel). Bei unvollständigem Verdau wurde nochmals mit 0,25 µl EcoRI, 0,5 µl 10-fach EcoRI-Puffer und 4,25 µl H<sub>2</sub>O für 6-8 h bei 37 °C inkubiert.

Die DNA wurde mittels Elektrophorese unter folgenden Bedingungen aufgetrennt: 0,8 %iges Agarosegel, 25-30 V, 24 h. Das Gel wurde unter UV-Licht mit einem Maßstab

fotografiert und anschließend 5-10 min in Depurinierungspuffer geschwenkt, mit Wasser abgespült und denaturiert. Hierzu wurde das Gel 30 min in Denaturierungspuffer schüttelnd inkubiert. Zuletzt erfolgte die Inkubation in Neutralisierungslösung für 30 min.

Für den Southern Blot wurden 6 Blätter Whatmanpapier und eine Nitrozellulosemembran in Größe des Gels zugeschnitten und mit 10-fach SSC-Puffer befeuchtet. Über einer Schale mit diesem Puffer wurde der Blot aufgebaut:

Ein Whatmanpapier wurde über einen Steg in Größe des Gels als Brücke gelegt. Die Enden des Papiers lagen im Puffer der Schale um eine konstante Zufuhr zu ermöglichen. Auf die Filterpapierbrücken wurden 3 feuchte Whatmanpapiere, das Agarosegel, eine Nitrozellulosemembran, 2 trockene Whatmanpapiere und ein 10 cm dicker Stapel aus Papiertüchern gelegt. Eine Plexiglasplatte mit einer Beschwerung (0,5 kg) schloss die Konstruktion ab.

Das Herausstreichen von Luftblasen zwischen den Schichten ermöglichte einen vollständigen Transfer und die Abdeckung der Gelränder mit Parafilm verhinderte einen Kurzschluss. Die Transferzeit betrug 24 h. Danach wurde die Konstruktion abgebaut und das Gel zusammen mit der Membran abgenommen. Die Taschen des Gels wurden mit Bleistift auf der Membran markiert. Daraufhin wurde die Membran 1 min im Denaturierungspuffer und 1 min im Neutralisationspuffer geschwenkt. Anschließend wurde die Membran für 2 h bei 200 °C erhitzt.

Zur Hybridisierung mit der Sonde wurde die Membran in 2-fach SSC-Puffer gelegt und in Gaze eingerollt in eine Hybridisierungsflasche gelegt. Bindestellen wurden durch die Inkubation mit 40 ml Hybridisierungspuffer für 4 h abgeblockt.

Die Sonde wurde durch einen EcoR1/BamH1-Verdau aus einem Vektor herausgeschnitten und anschließend durch eine Gelextraktion aufgereinigt. Die radioaktive Markierung von 30 ng DNA mit  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP erfolgte mittels *Ladderman labeling Kit* gemäß Herstellerangaben und die Reinigung der markierten Sonde mittels *Illustra MircoSpin G-50* Säulen gemäß Herstellerangaben. Im Filtrat sollte eine Radioaktivität von 10000-15000 cps messbar sein (nicht-eingebaute Nukleotide). Die Sonde wurde 3 min bei 95 °C denaturiert, anschließend 5 min auf Eis gekühlt und schließlich mit 5-10 ml frischem Hybridisierungspuffer in die zuvor entleerte Hybridisierungsflasche gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 65 °C für 24 h.

Am Folgetag wurden unspezifisch gebundene Fragmente von der Membran gewaschen: 30 min mit Waschpuffer I und anschließend in 10-minütigen Abständen mit Waschpuffer II. Zwischen den Wascheinheiten wurde die Radioaktivität der Membran bestimmt. Bei 70-80 cps wurde das Waschen gestoppt und die Membran in einem Plastikbeutel mit 1 ml 2-fach SSC-Puffer luftblasenfrei versiegelt. Die Bindung der Sonde wurde durch eine Autoradiographie visualisiert (Expositionszeit: 24 h; falls erforderlich auch länger bei -80 °C).

## 5.4 GENOTYPISIERUNG

### 5.4.1 R26 TYPISIERUNGS-PCR

*Prinzip:* Abbildung 5-2 zeigt schematisch die bei der R26 Typisierungs-PCR entstehenden Fragmente. Die PCR kann zur Bildung von zwei unterschiedlichen Produkten führen:

- (1) ein Fragment von 601 bp ausgehend von den Primern R26-FA und R26-RA
- (2) ein Fragment von 241 bp ausgehend von den Primern R26-FA und SpliceAB



PCR-Ansatz (einfach): Programm (Pegstar 96):

dNTPs (25mM je dNTP)	2,5 µl	95 °C	3 min	
10-fach DreamTaq™ Grüner Puffer	2,5 µl	95 °C	30 s	13 Zyklen; -1 °C pro Zyklus
Primer CreFS1	1,0 µl	67 °C	30 s	
Primer CreFS2	1,0 µl	72 °C	30 s	
DreamTaq™ DNA-Polymerase	0,125 µl	95 °C	30 s	20 Zyklen
H <sub>2</sub> O	16,875 µl	54 °C	30 s	
DNA	1 µl	72 °C	30 s	
		72 °C	5 min	
		4 °C	∞	

**5.4.3 TCAIM TYPISIERUNGS-PCR**

*Prinzip:* Die *Tcaim*-PCR amplifizierte ein Fragment von 739 bp innerhalb des *Tcaim*-Transgens. Die wildtypische *Tcaim*-Sequenz wurde nicht amplifiziert, da diese noch Intron-Sequenzen enthielt.

PCR-Ansatz (einfach): Programm (Pegstar 96):

dNTPs (25mM je dNTP)	2,5 µl	95 °C	2 min	
10-fach DreamTaq™ Grüner Puffer	2,5 µl	95 °C	15 s	30 Zyklen
Toagint2-fw	1,0 µl	67 °C	30 s	
pROSA_Asc_fw	1,0 µl	72 °C	90 s	
DreamTaq™ DNA-Polymerase	0,125 µl	72 °C	10 min	
H <sub>2</sub> O	16,875 µl			
DNA	1 µl	4 °C	∞	

**5.5 QUANTITATIVE ECHTZEIT-PCR (qRT-PCR: QUANTITATIVE REAL TIME PCR)**

*Prinzip:* Die qRT-PCR basiert auf den gleichen Prinzipien zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten wie eine gewöhnliche PCR. Gleichzeitig erlaubt sie die Quantifizierung von mRNA-Mengen in Zellen, wodurch die Expression bestimmter Gene unterschiedlicher Ansätze verglichen werden kann. Als Bezugspunkt dient hierbei die Expression eines sogenannten *housekeeping*-Gens (hier: *Hprt*), von welchem in allen Ansätzen eine gleichbleibende Expression angenommen wird. Aus den Zellen wird zunächst die RNA isoliert und anschließend in *copy* DNA (cDNA) umgeschrieben. Die Menge dieser cDNA wird gemäß einer gewöhnlichen PCR mit vor- und rückwärtsgerichteten Primern amplifiziert. Um die Reaktion spezifisch auf cDNA auszurichten und genomische DNA von der Amplifikation auszuschließen liegt das Amplikon über Exon-Exon-Grenzen. Bei der hier genutzten *TaqMan*-Methode kann eine Sonde im Amplikon binden. Diese ist mit 5'-Ende an einen Reporterfarbstoff gebunden (FAM: 6-Carboxyfluorescein) und am 3'-Ende an einen Quencher (TAMRA: Tetramethylrhodamine). Die Energie des ersteren Moleküls wird bei einer gewissen räumlichen Nähe auf das zweite Molekül übertragen und dadurch ausgelöscht (Förster-Resonanzenergietransfer). Durch den Abbau der Sonde durch die

Exonukleaseaktivität der Polymerase kommt es zu einer örtlichen Trennung beider Moleküle und eine mit jedem Zyklus steigende Fluoreszenzintensität wird messbar.

*Detailliertes Protokoll:* RNA aus  $1-5 \times 10^6$  Zellen wurde mittels *NucleoSpin® RNA II Kit* gemäß Herstellerangaben isoliert. Bestimmung der Konzentration und Reinheit erfolgte am *NanoDrop* und das Umschreiben in cDNA mit Hilfe des *QuantiTect Reverse Transcription Kit* gemäß Herstellerangaben. Primer und Sonden wurden durch Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Unter 4.8.2 sind die Sequenzen von Primer und Sonden gelistet. Primerpaare wurden entsprechend der unter 4.8.2 angegebenen Konzentrationen vorgemischt. Es wurden Doppelansätze pipettiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms 7500 System SDS v1.4.0. Die Ct (*Cycle threshold*)-Mittelwerte aus den Doppelansätzen wurden ermittelt und die Differenz zwischen Tcaim und Hprt bestimmt ( $\Delta Ct$ ). Die relative mRNA-Expression (x) wird dann folgendermaßen ermittelt:  $x = 2^{-\Delta Ct}$ . Die Qualität der cDNA wurde durch eine Intron-spezifische qRT-PCR bewertet.

PCR-Ansatz (doppelt):

Programm (Detektor7700):

TaqMan Mastermix	2,5 µl	50 °C	2 min	
Primermix	2,5 µl	95 °C	15 s	
Sonde	1,0 µl	95 °C	15 s	40
H <sub>2</sub> O	1,0 µl	60 °C	1 min	Zyklen
		4 °C	∞	

## 5.6 ZELLKULTUR VON PRIMÄRZELLEN

### 5.6.1 GENERIERUNG VON BMDCs

Femora und Tibiae von 8-12 Wochen alten Mäusen wurden entnommen und von Muskelgewebe gereinigt. Anschließend wurden die Knochen zur Desinfektion in 70 %igem Ethanol geschwenkt und in Medium überführt. Die Knochenenden wurden abgeschnitten, das Knochenmark mit einer PBS-gefüllten Spritze (Kanüle 27  $\frac{3}{4}$  G) herausgespült und die Markstränge zerteilt. Die Zellen wurden gewaschen und Erythrozyten lysiert. Hierzu wurden für 15 s 2 ml Ampuwa auf das aufgelockerte Pellet gegeben und die Reaktion anschließend mit BMDC-Medium gestoppt. Daraufhin wurden die Zellen gewaschen und die Zellsuspension filtriert (Porengröße: 100 µm). Zur Zellkultur wurden unbeschichtete 6-Lochplatten genutzt. Die Kultivierung erfolgte in BMDC-Medium mit 6 ng/ml GM-CSF (*Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) für 8 Tage bei einer Konzentration von  $0,5 \times 10^6$  Zellen/ml (Volumen: 4 ml/6 Loch). An jedem zweiten Tag wurde das Medium durch frisches ersetzt. Am Tag 6 wurden die Zellen mit eiskaltem PBS geerntet und auf  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und neu ausplattiert. BMDCs wurden entweder mit 1 µg/ml LPS für 24 h stimuliert oder unstimuliert bis zur Ernte am Tag 8 kultiviert. Reinheit und Reifung der Zellen wurde durch eine Oberflächenfärbung (CD11c, MHCII, CD86) durchflusszytometrisch analysiert.

Wurden die Vorläuferzellen aus dem Knochenmark nicht sofort genutzt, wurden sie nach der Aufarbeitung zur Einzelzellsuspension tiefgefroren. Hierzu wurden  $0,5-1 \times 10^7$  Zellen in BMDC-Einfriermedium aufgenommen und in einer Isopropanol-Kryobox eingefroren und bei  $-80^\circ\text{C}$  bis zur Nutzung gelagert.



### 5.6.2 ALLOGENE KOKULTUR

**Prinzip:** Die allogene Kokultur, unter bestimmten Bedingungen auch gemischte Lymphozyten-Reaktion (MLR: *mixed lymphocyte reaction*) genannt, ist eine Methode um *in vitro* die Alloreaktivität von T-Zellen zu testen bzw. Einflüsse darauf zu untersuchen. Hierbei können Leukozyten von Spender und Empfänger gemischt und anschließend über mehrere Tage kultiviert werden. Um speziell die Antwort des Empfängers, oft im Proliferationsverhalten der Zellen gemessen, auf den Spender zu testen, werden die Zellen des Spenders durch Bestrahlung oder Chemikalien in ihrer Proliferation arretiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Variante eingesetzt, die im Folgenden als allogene Kokultur bezeichnet wird. Hier wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Tieren auf C57BL/6 Hintergrund (oder vergleichbarem Hintergrund bei *Tcaim* KI Tieren) zusammen mit BMDCs auf BALB/c Hintergrund 4-5 Tage kultiviert. Beide Inzuchtlinien zeichnen sich durch eine komplette Unstimmigkeit im MHC-Haplotyp aus (BALB/c: H-2<sup>d</sup>; C57BL/6: H-2<sup>b</sup>).

**Detailliertes Protokoll:** Mäusen wurden Milz und Lymphknoten (brachiale, axillare, zervikale, lumbale, inguinale und mesenteriale) entnommen. Eine Einzelzellsuspension von Milz- und Lymphknotenzellen wurde hergestellt, indem die Organe getrennt voneinander durch ein Zellsieb (Porengröße: 100 µm) gedrückt und in einer 10 cm großen Petrischale mit 20 ml kaltem PBS aufgefangen wurden. Die Suspension wurde in ein 50 ml-Gefäß überführt. Das Sieb wurde ein weiteres Mal mit 10 ml PBS gespült, die Suspension ebenfalls überführt und die Zellen schließlich pelletiert (4 °C; 300 × g; 10 min). Zellen aus den Lymphknoten wurden in PBS mit 5 % FCS aufgenommen und filtriert (Porengröße: 40 µm).

Zellen aus der Milz wurden in 2 ml PBS resuspendiert. Anschließend wurden 4 ml Ampuwa auf die Zellsuspension gegeben und für 15 s unter Schütteln inkubiert. Die Reaktion mit 24 ml PBS/2 % FCS abgestoppt. Die Zellsuspension wurde filtriert (Porengröße: 40 µm) und pelletiert. Beide Zellsuspensionen wurden gezählt und im Falle einer folgenden Anreicherung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen vereinigt.

Die Isolierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen (negative Selektion) erfolgt mittels *CD4<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit II* gemäß Herstellerangaben. Angereicherte CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden zusammen mit den BMDCs in folgendem Verhältnis in Kokulturbedium ausplattiert:

Maßstab	CD4 <sup>+</sup> T-Zellen	BMDCs
96er Loch	$5 \times 10^5$	$4 \times 10^4$
48er Loch	$2,5 \times 10^6$	$2 \times 10^5$

Bei Kokulturen, die mit Zellen aus *Tcaim* KI Mäusen angesetzt wurden, folgte die Anreicherung von naiven T-Zellen durch eine durchflusszytometrische Sortierung (siehe in 5.9). Naive Zellen wurden zusammen mit BMDCs in oben genanntem Verhältnis für 5 Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> unter gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Bei Kokulturen, die im Rahmen der im Kapitel 3 beschriebenen Untersuchungen angesetzt wurden, wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen direkt mit BALB/c BMDCs gemischt und für 4 Tage unter bereits genannten Bedingungen kultiviert.

### 5.6.3 POLYKLONALE ZELLKULTUR

Zellen aus Milzen oder angereicherte CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden (wenn nicht anders angegeben) mit 5 µg/ml αCD3ε (Klon: 145-2C11) und 2 µg/ml αCD28 (Klon: 37.51) stimuliert. Eine 96-

Lochplatte wurde mit  $\alpha$ CD3 $\epsilon$ -Antikörper (50  $\mu$ l PBS mit 5  $\mu$ g/ml  $\alpha$ CD3 $\epsilon$  pro 96 Loch) für mindestens 1 h bei 37 °C beschichtet. Anschließend wurde der Überstand dekantiert und die Zellen mit der angegebenen Konzentration  $\alpha$ CD28 ausplattiert. Pro Loch wurden insgesamt  $5 \times 10^5$  Milz- oder Lymphknotenzellen ausplattiert. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden jeweils  $2,5 \times 10^5$  aufgereinigte CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit syngenem, angereicherten CD19<sup>+</sup> B-Zellen polyklonal stimuliert. Die Anreicherung der CD19<sup>+</sup> B-Zellen erfolgte mittels *EasySep Mouse B Cell Enrichment Kit* gemäß Herstellerangaben. CD4<sup>+</sup> T-Zellen und CD19<sup>+</sup> B-Zellen wurden im Verhältnis 1:1 ausplattiert (Maßstab: 96er-Loch, je  $2 \times 10^5$  CD4<sup>+</sup> T- und CD19<sup>+</sup> B-Zellen) und vor der Färbung für die Fluoreszenzmikroskopie mittels *CD4<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit II* von den B-Zellen getrennt.

## 5.7 MARKIERUNG MIT PROLIFERATIONS-FARBSTOFFEN

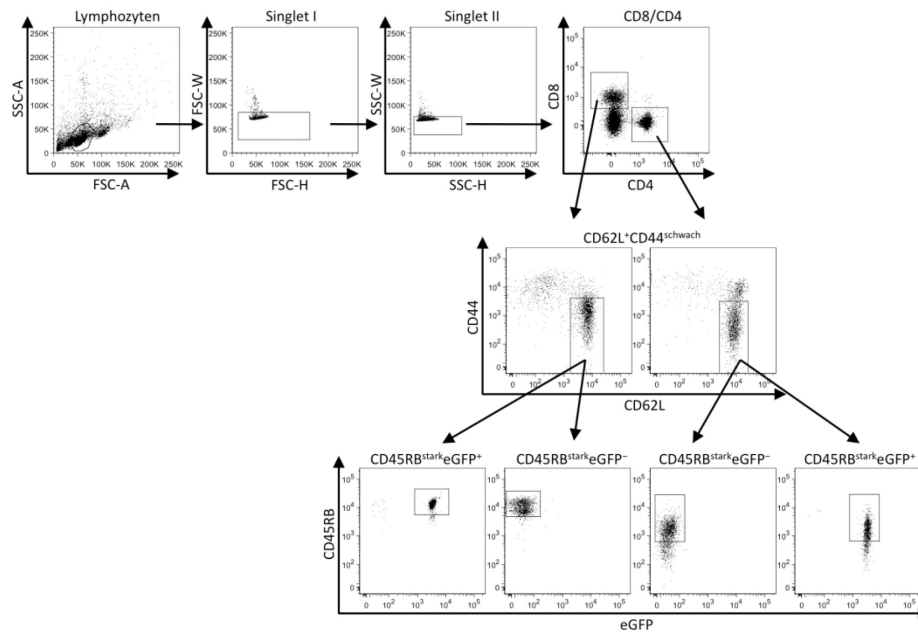
Zur Bestimmung der Proliferation wurden angereicherte CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit dem Proliferationsfarbstoff eFluor450 gemäß Herstellerangaben markiert.

## 5.8 SPEZIELLE BEHANDLUNGEN UND TH-ZELLPOLARISIERUNGEN

Eine TH1-Polarisierung wurde durch folgende Bedingungen erzielt: 10 ng/ml IL-12, 10  $\mu$ g/ml  $\alpha$ IL-4. Eine TH17-Polarisierung erfolgte unter Zugabe der folgenden Agenzien: 20 ng/ml IL-6, 10 ng/ml IL-23, 1 ng/ml TGF- $\beta$ , 10  $\mu$ g/ml  $\alpha$ IL-4 und 10  $\mu$ g/ml  $\alpha$ IFN- $\gamma$ . Falls angegeben, wurde  $\alpha$ CD44 (10  $\mu$ g/ml) oder CTLA-4-Ig (1  $\mu$ g/ml) eingesetzt. Spezifitäten und Klone sind unter Abschnitt 4.1 bzw. 4.11.1 aufgelistet.

## 5.9 ZELLSORTIERUNG MITTELS FLUORESCENZFÄRBUNG

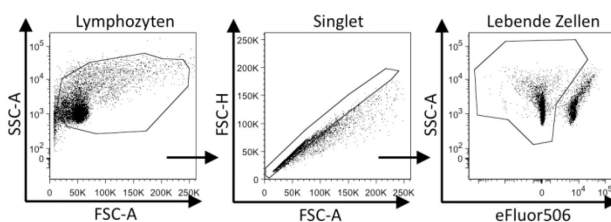
Die Zellsortierung mittels Durchflusszytometrie wurde von Dr. Desirée Kunkel und Antje Maluk vom BCRT (Berlin-Brandenburger Centrum für Regenerative Therapien) am FACSAria II durchgeführt. Eine Sortierungsstrategie für die Rekonstitution von *Rag-1* KO Mäusen ist in Abbildung 5-3 dargestellt. CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden zu folgenden Populationen sortiert: CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>schwach</sup>CD45RB<sup>stark</sup>. Zellen aus *Tcaim* KI Tieren wurden zudem noch zu einer reinen eGFP<sup>+</sup>-Population sortiert. Für Kokultorexperimente mit CD4<sup>+</sup> *Tcaim* KI T-Zellen wurde die gleiche Sortierungsstrategie angewandt. Da hier nur CD4<sup>+</sup> T-Zellen benötigt wurden, wurden diese Zellen vorher angereichert (magnetische Sortierung mittels *CD4<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit II*).



**Abbildung 5- 3. Sortierungsstrategie für Experimente zur Rekonstitution von *Rag-1* KO Mäusen und allogener Kokultur mit CD4<sup>+</sup> *Taim* KI T-Zellen.**

## 5.10 FLUORESZENZ-FÄRBUNGEN

Bei durchflusszytometrischen Messungen wurden, wenn nicht anders angegeben, Doubletten und tote Zellen von der folgenden Analyse ausgeschlossen. Diese *gating*-Strategie ist in Abbildung 5-4 dargestellt. Eine Lebend/Tot-Färbung wurde nicht durchgeführt, wenn es nachfolgende Färbungen nicht erlaubten (Bestimmung von mROS und intrazellulärem Kalzium). Auch die Analyse der transferierten Zellen 21 Tage nach der Transplantation erfolgte ohne Lebend/Tot-Färbung, da die Zellen direkt nach der Entnahme analysiert wurden. Konfigurationen der FACS-Geräte sind unter 8.2 angegeben.



**Abbildung 5- 4. Gating Strategie von den durchflusszytometrischen Analysen wurden immer Doubletten und in den meisten Fällen tote Zellen ausgeschlossen.**

### 5.10.1 APOPTOSE-FÄRBUNG

Färbungen von Annexin V und 7AAD wurden mittels Pufferset und Antikörpern von BD Bioscience gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

### 5.10.2 LEBEND/TOT-FÄRBUNG

$0,5-1 \times 10^6$  Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit einem fixierbaren Lebend/Tot-Farbstoff in der Fluoreszenz 506 für 15 min bei 4 °C gefärbt. 1  $\mu$ l einer 1:10 Verdünnung wurde in einem Gesamtvolumen von 100  $\mu$ l PBS pro Probe

eingesetzt. Die Färbung wurde mit 1 ml FACS-Puffer gestoppt und der ungebundene Farbstoff von den Zellen gewaschen.

### 5.10.3 OBERFLÄCHENFÄRBUNG

Die Zellen wurden mit einem den Fc-Rezeptor blockierenden Antikörper für 15 min bei 4 °C inkubiert und anschließend in FACS-Puffer gewaschen. Die Oberflächenfärbung erfolgte für 20 min bei 4 °C in 50 µl der vorbereiteten Antikörpermischung. Eingesetzte Konzentrationen und Klone der verwendeten Antikörper sind unter 4.1 aufgelistet.

### 5.10.4 INTRAZELLULÄRE FÄRBUNG

Zur intrazellulären Zytokinfärbung wurden  $5 \times 10^6$  Zellen für 4 h mit 1 µg/ml Ionomycin und 10 ng/ml PMA stimuliert. Nach 2 h wurde 2 µg/ml Brefeldin A zugesetzt um die Zytokinsekretion zu blockieren. Intrazelluläre Zytokinfärbungen wurden mittels *Cytofix/Cytoperm* und *Perm/Wash Kit* gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Konzentrationen und verwendete Antikörper sind unter 4.1 aufgelistet.

Die Färbung von Foxp3 und Helios erfolgte unter Verwendung des *Treg Detection Kits* gemäß Herstellerangaben.

Die Färbung der Pluripotenzmarker wurde unter Verwendung zweier Kits von BD Bioscience gemäß Herstellerangaben durchgeführt (Analysekit für humane bzw. humane und murine pluripotente Stammzellen).

### 5.10.5 MESSUNG DES KALZIUMEINSTROMS

$1 \times 10^7$  Zellen wurden mit PBS gewaschen und in 1 ml Zelllademedium aufgenommen. Um Unterschiede im Beladen der Zellen zu vermeiden, wurden Kontrollzellen und Zellen mit *Tcain* KI zu gleichen Teilen vermischt. Die Unterscheidung beider Zellpopulationen erfolgte anhand der *Egfp*-Expression. Probenicid (4 mM Endkonzentration) und Indo-1 (2 µg/ml Endkonzentration) wurden zugegeben und bei 37 °C 30 min inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit Zelllademedium gewaschen und daraufhin die Oberflächenfärbung durchgeführt. Hierzu wurde neben den fluoreszenzmarkierten Antikörpern 10 µg/ml αCD3ε (145-2C11) eingesetzt. Die Färbung erfolgte für 30 min bei 4 °C. Vor der Messung ruhten die Zellen noch 15 min bei 4 °C. Zur Kalziummessung wurde die Zellsuspension auf 37 °C erwärmt ( $1 \times 10^6$  Zellen pro Ansatz). Um eine Basislinie zu erhalten wurden die Zellen 1 min gemessen. Anschließend wurden 10 µg/ml αHamster-IgG zum Vernetzen des αCD3ε-Antikörpers zugegeben und für weitere 2 min gemessen. Nun erfolgte die Zugabe von CaCl<sub>2</sub> (Endkonzentration maximal 1 mM). Die Änderung des intrazellulären Kalziumspiegels (gemessen durch die Änderung der Fluoreszenz bei 400 nm und 475 nm, Filterkonfiguration siehe 8.2) wurde für 10 min aufgenommen.

### 5.10.6 MROS FÄRBUNG

$2 \times 10^6$  Zellen wurden nach der Stimulation geerntet und mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden für 15 min mit 5 µM MitoSOX™ in HBSS+Ca+Mg bei 37 °C inkubiert und danach mit kaltem PBS gewaschen. Da die Zellen innerhalb von 30 min nach der MitoSOX™ Färbung analysiert werden mussten, wurde die anschließende Oberflächenfärbung auf 10 min verkürzt. Die Messung erfolgte am Durchflusszytometer (Typ: LSRII).

### 5.10.7 ZYTOKINBESTIMMUNG IM ÜBERSTAND VON KOKULTUREN

Überstände von allogenen Kokulturen wurden an den angegebenen Tagen abgenommen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur Messung gelagert. Die Bestimmung der Zytokine erfolgte mittels maus-spezifischen FlowCytomix™ Basic und Simplex Kits (IL-2, IL-4, IL-17A, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ; ebioscience, San Diego, USA) gemäß Herstellerangaben und deren Messung am FACSCalibur. Die Analyse erfolgte mit Hilfe des Programms FlowCytomix Pro Version 2.4.

### 5.11 FLUORESZENZMIKROSKOPIE

$1 \times 10^6$  CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden wie unter 5.6.3 beschrieben stimuliert und mit 100 nM MitoTracker CMXRos gemäß Herstellerangaben markiert. Nach der Färbung wurden die Zellen mit einer 4 %igen Formaldehydlösung bei RT fixiert. Das Fixativ wurde nach 15 min von den Zellen gewaschen und diese in PBS mit 2 % FCS aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen auf die Objektträger zentrifugiert (800 rpm; 8 min), in Medium mit DAPI eingedeckt und am konfokalen Mikroskop (Zeiss LSM 510 Meta) durch Dr. Michael Schumann analysiert. Vergrößerung 630-fach. Optische Blöcke von 0,5  $\mu\text{m}$  über 3  $\mu\text{m}$  z-Achse wurden generiert.

### 5.12 ALLOGENE HAUTTRANSPLANTATION

*Rag-1* KO Mäuse wurden vor der Transplantation mit jeweils  $3 \times 10^5$  CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen rekonstituiert. Beide Zellpopulationen wurden zuvor zu naiven Zellen sortiert (vgl. 5.9). Zusätzlich hierzu wurden *Tcaim* überexprimierende Zellen zu eGFP<sup>+</sup> Zellen sortiert. Die Zellen wurden durch Ivo Panov (Insitut für medizinische Immunologie, Charité Berlin) in PBS in die Schwanzvene injiziert (Experimente aus Kapitel 2). Wildtypische C57BL/6 erhielten keine Vorbehandlung (Experimente aus Kapitel 3).

1-2 Tage nach der Injektion erhielten die Tiere ein allogenes Transplantat der Größe  $0.8 \times 1 \text{ cm}^2$  von BALB/c Schwanzhaut. Der Empfänger wurde mit 0,08 mg/g KG Ketamin und 0,012 mg/g Körpergewicht (KG) Xylazin intraperitoneal narkotisiert. Sobald die Betäubung wirkte, wurde die Rückenhaut mittig rasiert und Carprofen (0,1 mg/kg KG) als Analgesie subkutan in die Nackenfalte injiziert. Ließ sich der Zwischenzehenreflex nicht mehr auslösen, wurde die Maus fixiert und die Augen mit Augensalbe geschützt. Ein Wundbett wurde auf der Rückenmitte markiert und freipräpariert, ohne die *Fascia superficialis* zu verletzen. Das Wundbett wurde mit steriler, 0,9 %iger Kochsalzlösung befeuchtet und anschließend das Transplantat ins Wundbett eingepasst. Das Transplantat wurde mit 6 Einzelnähten befestigt und mit doppelagiger vasilinierter Gaze und einem Stück Mullkompressen bedeckt. Ein Verband aus selbsthaftender Mullbinde wurde angelegt und mit Tegaderm™ gesichert. Die Beweglichkeit und die ungehinderte Atmung der Maus wurden sichergestellt. Nach der Operation wurde dem Tier 5  $\mu\text{g/kg}$  KG Atipamezol subkutan appliziert. Auf diese Weise wurde die Wirkung des Xylazin aufgehoben und somit die Nachschlafzeit verkürzt. Nach der Transplantation wurden Gewicht und Anzeichen von Abstoßung täglich kontrolliert. Zur Analyse der Transplantat-Überlebenszeit wurden die Tiere 100 Tage überwacht. Andernfalls wurden die Tiere nach angegebenen Zeitpunkten mit Isofluran (Forene) narkotisiert, getötet, Milz, drainierende Lymphknoten (brachiale, axiale und inguinale) und Knochenmark

entnommen und analysiert. Transplantationen wurden von Christine Appelt (Insitut für medizinische Immunologie, Charité Berlin) durchgeführt.

### 5.13 STATISTIK

Für den Vergleich von Zellen bzw. Tieren unterschiedlichen Genotyps wurden nicht-parametrische Tests für nicht-verbundene Stichproben zur Berechnung der Signifikanz genutzt (Vergleich zweier Gruppen: Mann-Whitney-U-Test; Vergleich mehrerer Gruppen: Kruskal-Wallis-Test mit *post-hoc* Dunns Vergleich). Der Vergleich zwischen Zellen gleichen Ursprungs aber unterschiedlicher Behandlung erfolgte durch nicht-parametrische Tests für verbundene Stichproben (Vergleich zweier Gruppen: Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test; Vergleich mehrerer Gruppen: Friedman-Test mit *post-hoc* Dunns-Vergleich). Die Signifikanz für die Überlebenskurve wurde durch den Mantel-Cox-Test ermittelt. Eine lineare Regression wurde gerechnet um die Verbindung zwischen Zeit nach der Transplantation und Körpergewicht zu bewerten. Eine zweifaktorielle ANOVA untersuchte den Einfluss von TZR-Stimulation (ohne, früh (30 min), spät (60 min)) und *Tcaim*-Expression auf die mROS-Produktion. Signifikanzen wurden in den Abbildungen folgendermaßen dargestellt: \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$  und \*\*\* $p \leq 0,001$ . Zur statistischen Analyse wurde die Software GraphpadPrism V6 genutzt.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss von intra- (Kapitel 2) und extrazellulären Signalen (Kapitel 3) auf die Differenzierung und Aktivierung von alloreaktiven T-Zellen.

Im ersten Teil der Arbeit wurde der Einfluss des mitochondrialen Proteins TCAIM (*T cell activation inhibitor, mitochondrial*) auf die Aktivierung und Bildung von Gedächtnis-T-Zellen untersucht. TCAIM wurde bei der Suche nach Biomarkern zur Charakterisierung allogener Toleranz entdeckt und seine Expression korreliert positiv mit der Induktion allogener Toleranz und negativ mit der Abstoßung allogener Transplantate [54]. Verschiedene mitochondriale Proteine, wie TCAIM, werden während der T-Zellaktivierung herunterreguliert. Um den Einfluss von TCAIM in diesem Prozess zu untersuchen, wurde eine transgene Mauslinie durch einen zielgerichteten *knock-in* (KI) in den *Rosa26* Locus generiert. Eine konditionelle STOP-Kassette vor dem Transgen ermöglichte nach der Kreuzung mit einer *Cd4-Cre* transgenen Mauslinie dessen Expression in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Die konstante *Tcaim*-Expression inhibierte die spontane Bildung von Gedächtnis-T-Zellen in naiven Tieren. Zudem beeinflusste TCAIM die T-Zellrezeptor (TZR)-vermittelte Fission und Umverteilung von Mitochondrien. Die konstante *Tcaim*-Expression führte zu einer starken Reduktion der TZR-induzierten Bildung mitochondrialer radikaler Sauerstoffspezies. Zudem zeigten allogen-stimulierte CD4<sup>+</sup> *Tcaim* KI T-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen *in vitro* eine geringere Aktivierung, Proliferation und IL-2 Sekretion. In *Rag-1 knock-out* Mäuse transferierte T-Zellen aus *Tcaim* KI Mäusen waren nicht fähig ein allogenes Haut-Transplantat abzustößen, behielten einen naiven Phänotyp und konnten schlechter in das Knochenmark einwandern. Diese Ergebnisse zeigen, dass TCAIM durch die veränderte mitochondriale Fission und mROS Produktion wichtige Schritte in der Zellaktivierung und der Bildung von Gedächtnis-T-Zellen beeinflusst.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit dem Einfluss der CD44-Oberflächenexpression auf die Differenzierung von alloreaktiven T-Helfer (T<sub>H</sub>)-Zellen. CD44 ist ein wichtiger Aktivierungsmarker, dessen Expression Effektor- und Gedächtnis- von naiven T-Zellen unterscheidet. Zudem spielt es eine Rolle in der T-Zellaktivierung, da es mit der Lymphozyten-spezifischen Proteinkinase (LCK) assoziiert ist und dadurch die Signaltransduktion verstärken kann [206]. Die Stimulation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit allogenen dendritischen Zellen führte zur Bildung von drei verschiedenen Populationen: CD44<sup>+</sup>, CD44<sup>++</sup> und CD44<sup>+++</sup>. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* generierte alloreaktive T<sub>H</sub>17-Zellen wurden in der CD44<sup>+++</sup> Population, T<sub>H</sub>1-Zellen hingegen in der CD44<sup>++</sup> Population gefunden. Dieses Muster konnte durch polarisierende Bedingungen verstärkt werden. T<sub>H</sub>17-polarisierende Bedingungen erhöhten die Anzahl CD44<sup>+++</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen, während unter T<sub>H</sub>1-polarisierenden Bedingungen das Gegenteil der Fall war. Darüber hinaus war die IL-17-Sekretion durch Blockierung von CD44 stärker beeinflusst als die Ausschüttung von IFN- $\gamma$ . Sowohl eine geringe TZR- als auch eine geringe CD28-Stimulation unterstützte eher die Bildung von T<sub>H</sub>17- als T<sub>H</sub>1-Zellen. Unter genau diesen Bedingungen kann CD44 als kostimulatorisches Molekül die Signaltransduktion verstärken [208]. Tatsächlich zeigten ruhende allogenreaktive CD44<sup>+++</sup> T<sub>H</sub>-Zellen eine höhere Phosphorylierung der LCK nachgeschalteten Proteinkinase ZAP-70 als CD44<sup>++</sup> T<sub>H</sub>-Zellen. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass CD44 durch LCK die Signalgebung des TZR verstärken kann und damit die T<sub>H</sub>17-Differenzierung fördert.

## 7 SUMMARY

This doctoral thesis is divided into two different parts dealing with intracellular (chapter 2) and extracellular signals (chapter 3) which influence the activation and differentiation of allo-reactive T cells.

Within the first part, the influence of the mitochondrial Protein TCAIM (T cell activation inhibitor, mitochondrial) on T cell activation was investigated. TCAIM was discovered during the search for biomarkers to characterise allogeneic tolerance. It was demonstrated that *Tcaim* expression correlated positively with the induction of allogeneic tolerance but negatively with the rejection of allografts [54]. Mitochondria play an important role for T cell activation and the expression of several mitochondrial proteins, such as TCAIM, is down-regulated during T cell activation. To study effects of TCAIM during T cell activation, we generated a mouse strain with a *Tcaim* knock-in (KI) targeted to the *Rosa26* locus. Cell-specific *Tcaim* expression in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells was achieved by breeding these mice with *Cd4-Cre*-transgenic mice. A constant *Tcaim* expression inhibited spontaneous development of memory and effector T cells. As a mitochondrial protein, TCAIM changed morphology and dynamics of mitochondria upon TCR stimulation. Mitochondria of *Tcaim* KI CD4<sup>+</sup> T cells were unable to induce fission and to localise to sites of stimulation. Moreover, a constant *Tcaim* expression reduced the TCR-induced mitochondrial reactive oxygen species (mROS) production. *In vitro* activation of *Tcaim* KI CD4<sup>+</sup> T cells resulted in a decreased formation of CD44<sup>+</sup> effector cells and subsequently proliferation and cytokine release was impaired. Importantly, T cells from T cell-specific *Tcaim* knock-in mice tolerated allogeneic skin grafts upon transfer into *Rag-1* knock-out mice. CD4<sup>+</sup> T cells from *Tcaim* KI mice kept a naïve phenotype and were not able to accumulate within the bone marrow. Thus, by regulating TCR-induced mitochondrial distribution and ROS production, TCAIM controls important steps during T cell activation and memory formation.

The second part of this thesis dealt with the influence of CD44 surface expression level for T helper cell (T<sub>H</sub> cell) differentiation. CD44 is a prominent activation marker which distinguishes memory and effector T cells from their naïve counterparts. It also plays an important role in early T cell signalling events: it is associated with lymphocyte-specific protein kinase (LCK) and thereby it can enhance TCR signalling [206]. Stimulation of CD4<sup>+</sup> T cells with allogeneic dendritic cells resulted in the formation of three distinguishable populations: CD44<sup>+</sup>, CD44<sup>++</sup> and CD44<sup>+++</sup>. *In vitro* and *in vivo* generated allo-reactive T<sub>H</sub>17 cells were mainly CD44<sup>+++</sup> as compared to T<sub>H</sub>1 cells which were CD44<sup>++</sup>. This effect is strengthened under polarizing conditions. T<sub>H</sub>17 polarisation led to a shift toward the CD44<sup>+++</sup> population whereas T<sub>H</sub>1 polarisation diminishes this population. Furthermore, blocking CD44 decreases IL-17 secretion, while IFN- $\gamma$  is barely affected. Titration experiments revealed that low TCR- and co-stimulation supports T<sub>H</sub>17 rather than T<sub>H</sub>1 development. Under exactly these conditions it was reported that CD44 can act as co-stimulatory molecule and replace CD28 [208]. Indeed, rested CD44<sup>+++</sup>CD4<sup>+</sup> T cells contained already more phosphorylated ZAP-70 as compared to CD44<sup>++</sup> cells. Our results support the notion that CD44 enhances TCR signalling strength by delivering LCK, which is required to support T<sub>H</sub>17 development.



## 8 ANHANG

### 8.1 SEQUENZ DES *TcaIM*-LESERAHMENS

```

.....AT
.....-M

3  GTTTTGCCACTTGAGGCCTTTGAGGAGGTTTCGGCCTGAGGAAGGTCCTCCCTCATTGGCT
1  --F--C--H--L--R--P--L--R--R--F--G--L--R--K--V--L--P--H--W--L

63  TCACTACTCTCGAGCTTTATCAGGGGCAGAAGCCATCAACGCCTTGAGGCCTTTCTACTT
21  --H--Y--S--R--A--L--S--G--A--E--A--I--N--A--L--R--P--F--Y--F

123  TGCAGTGCATCCTGATTTCTTTGGACAGCACCCCAGGGAAAGGGAAGTCAATGAAAATTC
41  --A--V--H--P--D--F--F--G--Q--H--P--R--E--R--E--V--N--E--N--S

183  TCTTAAGAGATTAAGTGTCTATTTAGAAAAATCTCCAGAAACCAGGCTTCAAATCTCTGAA
61  --L--K--R--L--S--V--Y--L--E--N--L--Q--K--P--G--F--K--S--L--K

243  ACCAACTCAGCTTACATTTTATATAAGAGAAAAAACAGCCCAGAATTCCTCTGAAGGCCA
81  --P--T--Q--L--T--F--Y--I--R--E--K--T--A--Q--N--S--S--E--G--Q

303  GGAGCCTATCAGTACTACCGGATTCCGAGCAGTCAGATTTACTTTGCACAGCAGCGATCT
101  --E--P--I--S--T--T--G--F--R--A--V--R--F--T--L--H--S--S--D--L

363  GCTAAGCACAGTATTGTATATTCTCAACTCCTGCAGTTTGCCTGTTGAACACGTCCAAAG
121  --L--S--T--V--L--Y--I--L--N--S--C--S--L--P--V--E--H--V--Q--S

423  CTTGAACACTAATGTGCATTCCCAGCCTCTCAAGGAAGCTACAGGGATGCCTGACAGACC
141  --L--N--T--N--V--H--S--Q--P--L--K--E--A--T--G--M--P--D--R--P

483  CATCAAATGGCATAGGTCCTATTATTCTTTACTGGGTTCAAGGACCCTGATGAAGACCT
161  --I--K--W--H--R--S--Y--Y--S--F--T--G--F--K--D--P--D--E--D--L

543  CACACACGTCTCAAGAGTGGAACAACCCTAACGTCCTGGTTAGGTAGCAATGGGAAAGG
181  --T--H--V--S--R--V--E--T--T--L--T--S--W--L--G--S--N--G--K--G

603  TGCCGTGAAGAAGCTGAGGAACAGTCTGCCACTTCGGAAGGAGCTGGATCGCCTGAAGAA
201  --A--V--K--K--L--R--N--S--L--P--L--R--K--E--L--D--R--L--K--N

663  TGAGCTGTCTGAGCTTCTGCAGCTTTCAGACATCAGGTGGCAGAGAGGCTGGGGAGTTGC
221  --E--L--S--E--L--L--Q--L--S--D--I--R--W--Q--R--G--W--G--V--A

723  CCATCGCTGCAGCCAGCTGCACAGTCTCAGCCGCCTAGCACAGCAGAATCCGGGGCCACT
241  --H--R--C--S--Q--L--H--S--L--S--R--L--A--Q--Q--N--P--G--P--L

783  TCAGAATGTGAAAGGATGCACGGTTGTATTACAGACCGCTCCGGTATGAGTGCACCTGGG
261  --Q--N--V--K--G--C--T--V--V--F--T--D--R--S--G--M--S--A--L--G

843  CCATGTGATGCTGGGAACCATGGATGTCCACCACCACTGGACAAGGCTTTTTGAAAGCTT
281  --H--V--M--L--G--T--M--D--V--H--H--H--W--T--R--L--F--E--S--L

903  GCCAAGTTATTTTGACCTTCAGAGGAGAATGTCAGCCTTAGAAGCCCAAATAAGCAATCT
301  --P--S--Y--F--D--L--Q--R--R--M--S--A--L--E--A--Q--I--S--N--L

963  TCTAGGGGGAATCCAAGTGGTTTATATCGAAGAGTTGCAGCCAGCACTCACACTTGATCA
321  --L--G--G--I--Q--V--V--Y--I--E--E--L--Q--P--A--L--T--L--D--Q

1023  GTACTACTCTCTCCTCCACACCTTCTACAACCAGCTGCTGAGAAGCAGGGTGCCGCCCA
341  --Y--Y--S--L--L--H--T--F--Y--N--Q--L--L--R--S--R--V--P--P--H

```

```

1083 CCCCCACCCCCAGAGTCTGAGCGGCTTGCAGATGATCCTTAGCAGTGACAGGTATGCGCC
361 --P--H--P--Q--S--L--S--G--L--Q--M--I--L--S--S--D--R--Y--A--P

1143 AAGCTTGCATGAACTCGGGCATTGATATCCCAGCCCTCTCAGATCCAGCAAGCCTGCA
381 --S--L--H--E--L--G--H--F--D--I--P--A--L--S--D--P--A--S--L--Q

1203 GTCCTTCATGAGAACCAAAGCCCAGCAGGCGAGAGAAAACATGACTAGAAAGGGAGAAGTT
401 --S--F--M--R--T--K--A--Q--Q--A--R--E--N--M--T--R--R--E--K--L

1263 AAAAGTTATGGAAAATGAATTGATACAGGCTTCAACAAAGCAGTTTTCTCTGGAGAAGTT
421 --K--V--M--E--N--E--L--I--Q--A--S--T--K--Q--F--S--L--E--K--L

1323 GTATAAAGAGCCCAGCATTCTAGCAGACAGATGGTGGATTGCTGTAAGAGACTTCTTGA
441 --Y--K--E--P--S--I--S--S--R--Q--M--V--D--C--C--K--R--L--L--E

1383 ACAGTCGCTGCCATATCTGCATGGGATGCACCTCTGCGTCTCACATTTCTATTCTGTTAT
461 --Q--S--L--P--Y--L--H--G--M--H--L--C--V--S--H--F--Y--S--V--M

1443 GCAAGATGGAGACCTGTGCATCCCGTGGAAGTGAAGAAAGGAGAAGCCATGAAGTAA
481 --Q--D--G--D--L--C--I--P--W--N--W--K--K--G--E--A--M--K--*--

```

Die Sequenz des TCAIM Leserahmens sowie die Aminosäuresequenz wurde der cDNA NM\_001013405.1 entnommen (National Center for Biotechnology Information. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM\\_001013405.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001013405.1). (06.2009)).

## 8.2 KONFIGURATIONEN DER FACS-GERÄTE

### 8.2.1 FACSCALIBUR

Laser	Detektor	1. Pass	2. Pass	PMT	Fluorochrom
488 nm (15 mW)	A	560 SP	530/30 BP	FL1	FITC, Alexa 488, GFP, CFSE
	B		480/10 BP	SSC	
	C	640 LP	585/42 BP	FL2	PE, MitoSOX
	D	640 LP	670 LP	FL3	PerCP, PE-Cy5, PE-Cy7, 7AAD
640 nm (10mW)	C	640 LP	660/20 BP	FL4	APC, Alexa 647

### 8.2.2 LSRII

Laser	Detektor	1. Pass	2. Pass	PMT	Fluorochrom
488 nm (20 mW)	A	735 LP	780/60 BP	Blue 780/60	PE-Cy7, PE-H7, PE-A750
	B	635 LP	670/14 BP	Blue 670/14	PerCP, PE-Cy5, PE-A647, 7AAD
	C	600 LP	610/20 BP	Blue 610/20	PE-TexasRed (ECD), PI, PE-A610
	D	550 LP	575/26 BP	Blue 575/26	PE, MitoSOX
	E	505 LP	530/30 BP	Blue 530/30	FITC, Alexa 488, GFP, CFSE
	F	Leer	488/10 BP	SSC	
	G	Leer	Leer		
	H	leer	leer		
640 nm (40 mW)	A	735 LP	780/60 BP	Red 780/60	APC-Cy7, APC-A750
	B	680 LP	730/40 BP	Red 730/40	Alexa 700
	C	leer	660/20 BP	Red 660/20	APC, Alexa 647
405 nm (25 mW)	A	685	710/40 BP	Vio 710/40	Qdot 705
	B	635	655/40 BP	Vio 655/40	Qdot 655
	C	505	525/50 BP	Vio 525/50	Amcyan, Horizon V450
	D	Leer	440/40 BP	Vio 440/40	Pacific Blue, Alexa 405, Horizon V450
	E	Leer	Leer		
	F	Leer	Leer		
	G	Leer	Leer		
	H	Leer	Leer		

## 8.2.3 LSRFORTESSA

Laser	Detektor	1. Pass	2. Pass	PMT	Fluorochrom
488 nm (100 mW)	A	685 LP	696/40 BP	Blue 695/40	PerCP, 7AAD
	B	505 LP	525/50 BP	Blue 525/50	FITC, Alexa 488, GFP, CFSE
	C	Leer	488/10 BP	SSC	
561 nm (100 mW)	A	750 LP	780/60 BP	YG 780/60	PE-Cy7, PE-H7, PE-A750, PC7
	B	685 LP	710/50 BP	YG 710/50	PE-Cy5.5
	C	635 LP	670/30 BP	YG 670/30	PE-Cy5, PC5
	D	600 LP	610/20 BP	YG 610/20	PE-TexasRed (ECD), PI, PE-A610
	E	Leer	585/15 BP	YG 585/15	PE
	F	Leer	Leer		
	G	Leer	Leer		
	H	leer	leer		
640 nm (40 mW)	A	750 LP	780/60 BP	Red 780/60	APC-Cy7, APC-A750
	B	685 LP	710/50 BP	Red 710/50	Alexa 700, APC-A700
	C	leer	670/14 BP	Red 670/14	APC, Alexa 647
404 nm (50 mW)	A	705	780/14	Vio 780/60	Horizon V800, Qdot 800
	B	685	710/40 BP	Vio 710/40	Qdot 705, Qdot 700
	C	635	660/20 BP	Vio 660/20	Qdot 655
	D	600	610/20	Vio 610/20	Qdot 605
	E	505	525/50 BP	Vio 525/50	Amcyan, Horizon V450, Qdot 525
	F	Leer	450/50 BP	Vio 450/50	Pacific Blue, Alexa 405, Horizon V450
	G	Leer	Leer		
	H	Leer	Leer		
355 nm (60mW)	A	505	530/30	UV 530/30	Indo-1 (freies Ca <sup>2+</sup> )
	B	Leer	405/20	UV 405/20	Indo-1 (gebundenes Ca <sup>2+</sup> ), DAPI, Höchst
	C	Leer	Leer		

## 9 REFERENZEN

1. Janeway, C. A. J., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M. J. (2005). *Immunobiology* 6th ed. (Garland Science).
2. Neumann, J. (2008). *Immunbiologie* (Springer-Verlag).
3. Davis, D. M., and Dustin, M. L. (2004). What is the importance of the immunological synapse? *Trends Immunol.* 25, 323–327.
4. Friedl, P., den Boer, A. T., and Gunzer, M. (2005). Tuning immune responses: Diversity and adaptation of the immunological synapse. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 532–545.
5. Smith-Garvin, J. E., Koretzky, G. A., and Jordan, M. S. (2009). T cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 591–619.
6. Acuto, O., and Michel, F. (2003). CD28-mediated co-stimulation: A quantitative support for TCR signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 939–951.
7. Kamiński, M. M., Röth, D., Krammer, P. H., and Gülow, K. (2013). Mitochondria as oxidative signaling organelles in T-cell activation: physiological role and pathological implications. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. 61, 367–384.
8. Zhu, J., and Paul, W. E. (2010). Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res.* 20, 4–12.
9. Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A., and Coffman, R. L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136, 2348–2357.
10. Liu, Z., Fan, H., and Jiang, S. (2013). CD4+ T-cell subsets in transplantation. *Immunol. Rev.* 252, 183–191.
11. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., and Pillai, S. (2012). *Cellular and Molecular Immunology* 7th ed. (Saunders).
12. Harrington, L. E., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Turner, H., Murphy, T. L., Murphy, K. M., and Weaver, C. T. (2005). Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol.* 6, 1123–1132.
13. Park, H., Li, Z., Yang, X. O., Chang, S. H., Nurieva, R., Wang, Y.-H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., *et al.* (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat. Immunol.* 6, 1133–1141.
14. Bettelli, E., Korn, T., Oukka, M., and Kuchroo, V. K. (2008). Induction and effector functions of TH17 cells. *Nature* 453, 1051–1057.
15. Laan, M., Cui, Z. H., Hoshino, H., Lötvall, J., Sjöstrand, M., Gruenert, D. C., Skoogh, B. E., and Lindén, A. (1999). Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. *J. Immunol.* 162, 2347–2352.
16. Aggarwal, S., and Gurney, A. L. (2002). IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. *J. Leukoc. Biol.* 71, 1–8.
17. Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., and Kuchroo, V. K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 485–517.
18. Josefowicz, S. Z., Lu, L.-F., and Rudensky, A. Y. (2012). Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 531–564.

19. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-Tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). *J. Immunol.* *155*, 1151–1164.
20. Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* *299*, 1057–1061.
21. Khattri, R., Cox, T., Yasayko, S.-A., and Ramsdell, F. (2003). An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat. Immunol.* *4*, 337–342.
22. Fontenot, J. D., Gavin, M. A., and Rudensky, A. Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* *4*, 330–336.
23. Fontenot, J. D., Rasmussen, J. P., Williams, L. M., Dooley, J. L., Farr, A. G., and Rudensky, A. Y. (2005). Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* *22*, 329–341.
24. Thornton, A. M., Korty, P. E., Tran, D. Q., Wohlfert, E. A., Murray, P. E., Belkaid, Y., and Shevach, E. M. (2010). Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J. Immunol.* *184*, 3433–3441.
25. Gottschalk, R. A., Corse, E., and Allison, J. P. (2012). Expression of Helios in peripherally induced Foxp3+ regulatory T cells. *J. Immunol.* *188*, 976–980.
26. Sallusto, F., Geginat, J., and Lanzavecchia, A. (2004). Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu. Rev. Immunol.* *22*, 745–763.
27. Osborne, L. C., and Abraham, N. (2010). Regulation of memory T cells by  $\gamma$ c cytokines. *Cytokine* *50*, 105–113.
28. Sallusto, F., Lenig, D., Fo, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* *401*, 708–712.
29. Mueller, S. N., Gebhardt, T., Carbone, F. R., and Heath, W. R. (2013). Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence. *Annu. Rev. Immunol.* *31*, 137–161.
30. Oehen, S., and Brduscha-Riem, K. (1998). Differentiation of naive CTL to effector and memory CTL: correlation of effector function with phenotype and cell division. *J. Immunol.* *161*, 5338–5346.
31. Reinhardt, R. L., Khoruts, A., Merica, R., Zell, T., and Jenkins, M. K. (2001). Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature* *410*, 101–105.
32. Masopust, D., Vezys, V., Marzo, A. L., and Lefrançois, L. (2001). Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science* *291*, 2413–2417.
33. Wherry, E. J., Teichgräber, V., Becker, T. C., Masopust, D., Kaeck, S. M., Antia, R., von Andrian, U. H., and Ahmed, R. (2003). Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat. Immunol.* *4*, 225–234.
34. Roberts, A. D., Ely, K. H., and Woodland, D. L. (2005). Differential contributions of central and effector memory T cells to recall responses. *J. Exp. Med.* *202*, 123–133.
35. Bouneaud, C., Garcia, Z., Kourilsky, P., and Pannetier, C. (2005). Lineage relationships, homeostasis, and recall capacities of central- and effector-memory CD8 T cells in vivo. *J. Exp. Med.* *201*, 579–590.

36. Hikono, H., Kohlmeier, J. E., Takamura, S., Wittmer, S. T., Roberts, A. D., and Woodland, D. L. (2007). Activation phenotype, rather than central- or effector-memory phenotype, predicts the recall efficacy of memory CD8<sup>+</sup> T cells. *J. Exp. Med.* **204**, 1625–1636.
37. Unsoeld, H., Krautwald, S., Voehringer, D., Kunzendorf, U., and Pircher, H. (2002). Cutting edge: CCR7<sup>+</sup> and CCR7<sup>-</sup> memory T cells do not differ in immediate effector cell function. *J. Immunol.* **169**, 638–641.
38. Budd, R. C., Cerottini, J. C., Horvath, C., Bron, C., Pedrazzini, T., Howe, R. C., and MacDonald, H. R. (1987). Distinction of virgin and memory T lymphocytes. Stable acquisition of the Pgp-1 glycoprotein concomitant with antigenic stimulation. *J. Immunol.* **138**, 3120–3129.
39. Afzali, B., Lechler, R. I., and Hernandez-Fuentes, M. P. (2007). Allorecognition and the alloresponse: clinical implications. *Tissue Antigens* **69**, 545–556.
40. Rocha, P. N., Plumb, T. J., Crowley, S. D., and Coffman, T. M. (2003). Effector mechanisms in transplant rejection. *Immunol. Rev.* **196**, 51–64.
41. Faustman, D. L., Steinmant, R. M., Gebel, H. M., Hauptfeldt, V., Davie, J. M., and Lacy, P. E. (1984). Prevention of rejection of murine islet allografts by pretreatment with anti-dendritic cell antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 3864–3868.
42. Rock, K. L., and Shen, L. (2005). Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance. *Immunol. Rev.* **207**, 166–183.
43. Herrera, O. B., Golshayan, D., Tibbott, R., Salcido Ochoa, F., James, M. J., Marelli-Berg, F. M., and Lechler, R. I. (2004). A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells. *J. Immunol.* **173**, 4828–4837.
44. Afzali, B., Lombardi, G., Lechler, R. I., and Lord, G. M. (2007). The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin. Exp. Immunol.* **148**, 32–46.
45. Verbist, K. C., Wang, R., and Green, D. R. (2012). T cell metabolism and the immune response. *Semin. Immunol.* **24**, 399–404.
46. Wahl, D. R., Byersdorfer, C. A., Ferrara, J. L. M., Opipari, A. W., and Glick, G. D. (2012). Distinct metabolic programs in activated T cells: opportunities for selective immunomodulation. *Immunol. Rev.* **249**, 104–115.
47. Balaban, R. S., Nemoto, S., and Finkel, T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* **120**, 483–495.
48. Reth, M. (2002). Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. *Nat. Immunol.* **3**, 1129–1134.
49. Junker, C., and Hoth, M. (2011). Immune synapses: mitochondrial morphology matters. *EMBO J.* **30**, 1187–1189.
50. Quintana, A., and Hoth, M. (2012). Mitochondrial dynamics and their impact on T cell function. *Cell Calcium* **52**, 57–63.
51. Reichenbach, J., Schubert, R., Horvath, R., Petersen, J., Fütterer, N., Malle, E., Stumpf, A., Gebhardt, B. R., Koehl, U., Schraven, B., *et al.* (2006). Fatal neonatal-onset mitochondrial respiratory chain disease with T cell immunodeficiency. *Pediatr. Res.* **60**, 321–326.
52. Dunning, C. J. R., McKenzie, M., Sugiana, C., Lazarou, M., Silke, J., Connelly, A., Fletcher, J. M., Kirby, D. M., Thorburn, D. R., and Ryan, M. T. (2007). Human CIA30 is

- involved in the early assembly of mitochondrial complex I and mutations in its gene cause disease. *EMBO J.* 26, 3227–3237.
53. Fassone, E., Taanman, J., Hargreaves, I. P., Sebire, N. J., Cleary, M. A., Burch, M., and Rahman, S. (2011). Mutations in the mitochondrial complex I assembly factor NDUFAF1 cause fatal infantile hypertrophic cardiomyopathy. *J. Med. Genet.* 48, 691–697.
  54. Sawitzki, B., Bushell, A., Steger, U., Jones, N., Risch, K., Siepert, A., Lehmann, M., Schmitt-Knosalla, I., Vogt, K., Gebuhr, I., *et al.* (2007). Identification of gene markers for the prediction of allograft rejection or permanent acceptance. *Am. J. Transplant.* 7, 1091–1102.
  55. Constant, S. L., and Bottomly, K. (1997). Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 297–322.
  56. Vincenti, F., Charpentier, B., Vanrenterghem, Y., Rostaing, L., Bresnahan, B., Darji, P., Massari, P., Mondragon-Ramirez, G. A., Agarwal, M., Di Russo, G., *et al.* (2010). A phase III study of belatacept-based immunosuppression regimens versus cyclosporine in renal transplant recipients (BENEFIT study). *Am. J. Transplant* 10, 535–546.
  57. Sawitzki, B., Schlickeiser, S., Reinke, P., and Volk, H.-D. (2011). Monitoring tolerance and rejection in organ transplant recipients. *Biomarkers* 16 Suppl 1, S42–50.
  58. Claros, M. G., and Vincens, P. (1996). Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur. J. Biochem.* 241, 779–786.
  59. Claros, M. G., and Vingsen, P. (1999). <http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html> (26.10.2013).
  60. Chacinska, A., Koehler, C. M., Milenkovic, D., Lithgow, T., and Pfanner, N. (2009). Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* 138, 628–644.
  61. Keeren, K., Friedrich, M., Gebuhr, I., Philipp, S., Sabat, R., Sterry, W., Brandt, C., Meisel, C., Grütz, G., Volk, H.-D., *et al.* (2009). Expression of tolerance associated gene-1, a mitochondrial protein inhibiting T cell activation, can be used to predict response to immune modulating therapies. *J. Immunol.* 183, 4077–4087.
  62. Frey, T. G., and Mannella, C. A. (2000). The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* 25, 319–324.
  63. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., and Stryer, L. (2003). *Biochemie* 5th ed. (Spektrum Akademischer Verlag).
  64. Okamoto, K., and Shaw, J. M. (2005). Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* 39, 503–536.
  65. Westermann, B. (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 872–884.
  66. De Brito, O. M., and Scorrano, L. (2008). Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* 456, 605–610.
  67. Friedman, J. R., Lackner, L. L., West, M., DiBenedetto, J. R., Nunnari, J., and Voeltz, G. K. (2011). ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science* 334, 358–362.
  68. Hollenbeck, P. J., and Saxton, W. M. (2005). The axonal transport of mitochondria. *J. Cell Sci.* 118, 5411–5419.



69. Jensen, P. K. (1966). Antimycin-insensitive oxidation of succinate and reduced nicotinamide-adenine dinucleotide in electron-transport particles. *Biochim. Biophys. Acta* 122, 157–166.
70. Hinkle, P. C., Butow, R. A., Racker, E., and Chance, B. (1967). Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. XV. Reverse electron transfer in the flavin-cytochrome b region of the respiratory chain of beef heart submitochondrial particles. *J. Biol. Chem.* 242, 5169–5173.
71. Loschen, G., Flohé, L., and Chance, B. (1971). Respiratory chain linked H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in pigeon heart mitochondria. *FEBS Lett.* 18, 261–264.
72. Dionisi, O., Galeotti, T., Terranova, T., and Azzi, A. (1975). Superoxide radicals and hydrogen peroxide formation in mitochondria from normal and neoplastic tissues. *Biochim. Biophys. Acta* 403, 292–300.
73. Cadenas, E. (2004). Mitochondrial free radical production and cell signaling. *Mol. Aspects Med.* 25, 17–26.
74. Hirst, J., King, M. S., and Pryde, K. R. (2008). The production of reactive oxygen species by complex I. *Biochem. Soc. Trans.* 36, 976–980.
75. Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 417, 1–13.
76. Starkov, A. A., Fiskum, G., Chinopoulos, C., Lorenzo, B. J., Browne, S. E., Patel, M. S., and Beal, M. F. (2004). Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *J. Neurosci.* 24, 7779–7788.
77. Brand, M. D. (2010). The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp. Gerontol.* 45, 466–472.
78. Finkel, T. (2011). Signal transduction by reactive oxygen species. *J. Cell Biol.* 194, 7–15.
79. Chance, B., Sies, H., and Boveris, A. (1979). Hydroperoxide Metabolism in Mammalian Organs. *Physiol. Rev.* 59, 527–605.
80. Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82, 47–95.
81. Murphy, M. P., and Siegel, R. M. (2013). Mitochondrial ROS fire up T cell activation. *Immunity* 38, 201–202.
82. Kamiński, M. M., Sauer, S. W., Kamiński, M., Opp, S., Ruppert, T., Grigaravicius, P., Grudnik, P., Gröne, H.-J., Krammer, P. H., and Gülow, K. (2012). T cell activation is driven by an ADP-dependent glucokinase linking enhanced glycolysis with mitochondrial reactive oxygen species generation. *Cell Rep.* 2, 1300–1315.
83. Baixauli, F., Martín-Cófreces, N. B., Morlino, G., Carrasco, Y. R., Calabia-Linares, C., Veiga, E., Serrador, J. M., and Sánchez-Madrid, F. (2011). The mitochondrial fission factor dynamin-related protein 1 modulates T-cell receptor signalling at the immune synapse. *EMBO J.* 30, 1238–1250.
84. Abarca-Rojano, E., Muñoz-Hernández, S., Moreno-Altamirano, M. M. B., Mondragón-Flores, R., Enriquez-Rincón, F., and Sánchez-García, F. J. (2009). Re-organization of mitochondria at the NK cell immune synapse. *Immunol. Lett.* 122, 18–25.
85. Quintana, A., Schwindling, C., Wenning, A. S., Becherer, U., Rettig, J., Schwarz, E. C., and Hoth, M. (2007). T cell activation requires mitochondrial translocation to the immunological synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 14418–14423.

86. Schwindling, C., Quintana, A., Krause, E., and Hoth, M. (2010). Mitochondria positioning controls local calcium influx in T cells. *J. Immunol.* **184**, 184–190.
87. Contento, R. L., Campello, S., Trovato, A. E., Magrini, E., Anselmi, F., and Viola, A. (2010). Adhesion shapes T cells for prompt and sustained T-cell receptor signalling. *EMBO J.* **29**, 4035–4047.
88. Quintana, A., Pasche, M., Junker, C., Al-Ansary, D., Rieger, H., Kummerow, C., Nuñez, L., Villalobos, C., Meraner, P., Becherer, U., *et al.* (2011). Calcium microdomains at the immunological synapse: how ORAI channels, mitochondria and calcium pumps generate local calcium signals for efficient T-cell activation. *EMBO J.* **30**, 3895–3912.
89. Yu, T., Robotham, J. L., and Yoon, Y. (2006). Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 2653–2658.
90. Koopman, W. J. H., Verkaart, S., Visch, H. J., Vries, S. V. E., Nijtmans, L. G. J., Smeitink, J. A. M., and Willems, P. H. G. M. (2007). Human NADH: ubiquinone oxidoreductase deficiency: radical changes in mitochondrial morphology? *Am. J. Physiol. Physiol.* **293**, 22–29.
91. Fan, X., Hussien, R., and Brooks, G. A. (2010). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced mitochondrial fragmentation in C2C12 myocytes. *Free Radic. Biol. Med.* **49**, 1646–1654.
92. Jendrach, M., Mai, S., Pohl, S., Vöth, M., and Bereiter-Hahn, J. (2008). Short- and long-term alterations of mitochondrial morphology, dynamics and mtDNA after transient oxidative stress. *Mitochondrion* **8**, 293–304.
93. Putney, J. W. (1990). Receptor-regulated calcium entry. *Pharmacol. Ther.* **48**, 427–34.
94. Parekh, A. B., and Penner, R. (1997). Store Depletion and Calcium Influx. *Physiol. Rev.* **77**, 901–930.
95. Zweifach, A., and Lewis, R. S. (1995). Rapid inactivation of depletion-activated calcium current (ICRAC) due to local calcium feedback. *J. Gen. Physiol.* **105**, 209–226.
96. Hoth, M., Button, D. C., and Lewis, R. S. (2000). Mitochondrial control of calcium-channel gating: a mechanism for sustained signaling and transcriptional activation in T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 10607–10612.
97. McCormack, J. G., and Osbaldeston, N. J. (1990). The use of the Ca<sup>2+</sup>-sensitive intramitochondrial dehydrogenases and entrapped fura-2 to study Sr<sup>2+</sup> and Ba<sup>2+</sup> transport across the inner membrane of mammalian mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **244**, 239–244.
98. McCormack, J. G., Halestrap, A. P., and Denton, R. M. (1990). Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiol. Rev.* **70**, 391–425.
99. Brookes, P. S., Yoon, Y., Robotham, J. L., Anders, M. W., and Sheu, S. (2004). Calcium, ATP and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am. J. Physiol.* **287**, C817–C833.
100. Singh, D. K., Kumar, D., Siddiqui, Z., Basu, S. K., Kumar, V., and Rao, K. V. S. (2005). The strength of receptor signaling is centrally controlled through a cooperative loop between Ca<sup>2+</sup> and an oxidant signal. *Cell* **121**, 281–293.
101. Singaravelu, K., Nelson, C., Bakowski, D., de Brito, O. M., Ng, S.-W., Di Capite, J., Powell, T., Scorrano, L., and Parekh, A. B. (2011). Mitofusin 2 regulates STIM1 migration from the Ca<sup>2+</sup> store to the plasma membrane in cells with depolarized mitochondria. *J. Biol. Chem.* **286**, 12189–12201.

102. Chaudhri, G., Clark, I. A., Hunt, N. H., Cowden, W. B., and Ceredig, R. (1986). Effect of antioxidants on primary alloantigen-induced T cell activation and proliferation. *J. Immunol.* **137**, 2646–2652.
103. Chaudhri, G., Hunt, N. H., Clark, I. A., and Ceredig, R. (1988). Antioxidants inhibit proliferation and cell surface expression of receptors for interleukin-2 and transferrin in T lymphocytes stimulated with phorbol myristate acetate and ionomycin. *Cell. Immunol.* **115**, 204–213.
104. Kamiński, M. M., Sauer, S. W., Klemke, C.-D., Süss, D., Okun, J. G., Krammer, P. H., and Gülow, K. (2010). Mitochondrial reactive oxygen species control T cell activation by regulating IL-2 and IL-4 expression: mechanism of ciprofloxacin-mediated immunosuppression. *J. Immunol.* **184**, 4827–4841.
105. Sena, L. A., Li, S., Jairaman, A., Prakriya, M., Ezponda, T., Hildeman, D. A., Wang, C.-R., Schumacker, P. T., Licht, J. D., Perlman, H., *et al.* (2013). Mitochondria are required for antigen-specific T cell activation through reactive oxygen species signaling. *Immunity* **38**, 225–236.
106. Gill, T., and Levine, A. D. (2013). Mitochondria-derived hydrogen peroxide selectively enhances T cell receptor-initiated signal transduction. *J. Biol. Chem.* **288**, 26246–26255.
107. Schreck, R., Rieberl, P., and Baeuerle, P. A. (1991). Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* **10**, 2247–2258.
108. Van der Windt, G. J. W., Everts, B., Chang, C.-H., Curtis, J. D., Freitas, T. C., Amiel, E., Pearce, E. J., and Pearce, E. L. (2012). Mitochondrial respiratory capacity is a critical regulator of CD8+ T cell memory development. *Immunity* **36**, 68–78.
109. Pearce, E. L. (2010). Metabolism in T cell activation and differentiation. *Curr. Opin. Immunol.* **22**, 314–320.
110. Roos, D., and Loos, J. A. (1973). Changes in the carbohydrate metabolism of mitogenically stimulated human peripheral lymphocytes: II. Relative importance of glycolysis and oxidative phosphorylation on phytohaemagglutinin stimulation. *Exp. Cell Res.* **77**, 127–135.
111. Tretter, L., Takacs, K., Hegedus, V., and Adam-Vizi, V. (2007). Characteristics of alpha-glycerophosphate-evoked H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in brain mitochondria. *J. Neurochem.* **100**, 650–663.
112. Schenkel, J. (2006). *Transgene Tiere* 2nd ed. (Springer-Verlag).
113. Gordon, J. W., and Ruddle, F. H. (1981). Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science*. **214**, 1244–1246.
114. Jaenisch, R. (1980). Retroviruses and embryogenesis: microinjection of Moloney leukemia virus into midgestation mouse embryos. *Cell* **19**, 181–188.
115. Jaenisch, R. (1976). Germ line integration and Mendelian transmission of the exogenous Moloney leukemia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **73**, 1260–1264.
116. Le Provost, F., Lillico, S., Passet, B., Young, R., Whitelaw, B., and Vilotte, J.-L. (2010). Zinc finger nuclease technology heralds a new era in mammalian transgenesis. *Trends Biotechnol.* **28**, 134–141.

117. Meyer, M., de Angelis, M. H., Wurst, W., and Kühn, R. (2010). Gene targeting by homologous recombination in mouse zygotes mediated by zinc-finger nucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 15022–15026.
118. Orban, P. C., Chui, D., and Marth, J. D. (1992). Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 6861–6865.
119. Gu, H., Marth, J. D., Orban, P. C., and Mossmann, H. (1994). Deletion of a DNA polymerase IP Gene segment in T Cells using cell type-specific gene targeting type deletion. *Science*. *265*, 103–106.
120. Sternberg, N., and Hamilton, D. (1981). Bacteriophage  $\phi$ I Site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J. Mol. Biol.* *150*, 467–486.
121. Rossant, J., Nutter, L. M. J., and Gertsenstein, M. (2011). Engineering the embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 7659–7660.
122. Friedrich, G., and Soriano, P. (1991). Promoter traps in embryonic stem cells: A genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes Dev.* *5*, 1513–1523.
123. Perez-Pinera, P., Ousterout, D. G., Brown, M. T., and Gersbach, C. A. (2012). Gene targeting to the ROSA26 locus directed by engineered zinc finger nucleases. *Nucleic Acids Res.* *40*, 3741–3752.
124. Zambrowicz, B. P., Imamoto, A., Fiering, S., Herzenberg, L. A., Kerr, W. G., and Soriano, P. (1997). Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 3789–3794.
125. Mao, X., Fujiwara, Y., Orkin, S. H. (1999). Improved reporter strain for monitoring Cre recombinase-mediated DNA excisions in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 5037–5042.
126. Soriano, P. (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat. Genet.* *21*, 70–71.
127. San Filippo, J., Sung, P., and Klein, H. (2008). Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu. Rev. Biochem.* *77*, 229–257.
128. Niwa, H., Miyazaki, J., and Smith, A. G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat. Genet.* *24*, 372–376.
129. Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., and Yamanaka, S. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* *113*, 631–642.
130. Avilion, A. A., Nicolis, S. K., Pevny, L. H., Perez, L., Vivian, N., and Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* *17*, 126–140.
131. Henderson, J. K., Draper, J. S., Baillie, H. S., Fishel, S., Thomson, J. A., Moore, H., and Andrews, P. W. (2002). Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens. *Stem Cells* *20*, 329–337.

132. Sugawara, A., Goto, K., Sotomaru, Y., Sofuni, T., and Ito, T. (2006). Current status of chromosomal abnormalities in mouse embryonic stem cell lines used in Japan. *Comp. Med.* 56, 31–34.
133. Ben-David, U., and Benvenisty, N. (2012). High prevalence of evolutionarily conserved and species-specific genomic aberrations in mouse pluripotent stem cells. *Stem Cells* 30, 612–622.
134. Gropp, A., Winking, H., Herbst, E. W., and Claussen, C. P. (1983). Murine trisomy: developmental profiles of the embryo, and isolation of trisomic cellular systems. *J. Exp. Zool.* 228, 253–269.
135. Liu, X., Wu, H., Loring, J., Hormuzdi, S., Disteché, C. M., Bornstein, P., and Jaenisch, R. (1997). Trisomy eight in ES cells is a common potential problem in gene targeting and interferes with germ line transmission. *Dev. Dyn.* 209, 85–91.
136. Lee, P. P., Fitzpatrick, D. R., Beard, C., Jessup, H. K., Lehar, S., Makar, K. W., Pérez-Melgosa, M., Sweetser, M. T., Schlissel, M. S., Nguyen, S., *et al.* (2001). A critical role for Dnmt1 and DNA methylation in T cell development, function, and survival. *Immunity* 15, 763–774.
137. Starr, T. K., Jameson, S. C., and Hogquist, K. A. (2003). Positive and negative selection of T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 139–176.
138. Tait, S. W. G., and Green, D. R. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 621–632.
139. Lecoœur, H., Ledru, E., Prévost, M. C., and Gougeon, M. L. (1997). Strategies for phenotyping apoptotic peripheral human lymphocytes comparing ISNT, annexin-V and 7-AAD cytofluorometric staining methods. *J. Immunol. Methods* 209, 111–123.
140. Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., and Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods* 184, 39–51.
141. Schmid, I., Krall, W. J., Uittenbogaart, C. H., Braun, J., and Giorgi, J. V. (1992). Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. *Cytometry* 13, 204–208.
142. June, C. H., Abe, R., and Rabinovitch, P. S. (2001). Measurement of intracellular calcium ions by flow cytometry. *Curr. Protoc. Cytom.* 2, Unit 9.8–9.8.19.
143. Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R. S., Herrup, K., Tonegawa, S., and Papaioannou, V. E. (1992). RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 68, 869–877.
144. Powrie, F., Leach, M. W., Mauze, S., Caddle, L. B., and Coffman, R. L. (1993). Phenotypically distinct subsets of CD4<sup>+</sup> T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. *Int. Immunol.* 5, 1461–1471.
145. Tokoyoda, K., Zehentmeier, S., Hegazy, A. N., Albrecht, I., Grün, J. R., Löhning, M., and Radbruch, A. (2009). Professional memory CD4<sup>+</sup> T lymphocytes preferentially reside and rest in the bone marrow. *Immunity* 30, 721–730.
146. Nichols, J., Evans, E. P., and Smith, A. G. (1990). Establishment of germ-line-competent embryonic stem (ES) cells using differentiation inhibiting activity. *Development* 110, 1341–1348.

147. Moran, J. L., Levorse, J. M., and Vogt, T. F. (1999). Limbs move beyond the Radical fringe. *Nature* 399, 742–743.
148. Transgenic mouse facility UC Irvine (2011). <http://www.research.uci.edu/tmf/constructDesign.htm> (24.11.2013).
149. Smirnova, E., Shurland, D. L., Ryazantsev, S. N., and van der Bliek, A. M. (1998). A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. *J. Cell Biol.* 143, 351–358.
150. Pitts, K. R., Yoon, Y., Krueger, E. W., and McNiven, M. A. (1999). The dynamin-like protein DLP1 is essential for normal distribution and morphology of the endoplasmic reticulum and mitochondria in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* 10, 4403–4417.
151. Quintana, A., Schwarz, E. C., Schwindling, C., Lipp, P., Kaestner, L., and Hoth, M. (2006). Sustained activity of calcium release-activated calcium channels requires translocation of mitochondria to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 281, 40302–9.
152. Yi, J. S., Holbrook, B. C., Michalek, R. D., Laniewski, N. G., and Grayson, J. M. (2006). Electron transport complex I is required for CD8+ T cell function. *J. Immunol.* 177, 852–862.
153. Kaminski, M., Kiessling, M., Süss, D., Krammer, P. H., and Gülow, K. (2007). Novel role for mitochondria: protein kinase C theta-dependent oxidative signaling organelles in activation-induced T-cell death. *Mol. Cell. Biol.* 27, 3625–3639.
154. Fonteriz, R. I., de la Fuente, S., Moreno, A., Lobatón, C. D., Montero, M., and Alvarez, J. (2010). Monitoring mitochondrial [Ca(2+)] dynamics with rhod-2, ratiometric pericam and aequorin. *Cell Calcium* 48, 61–69.
155. Akimzhanov, A. M., and Boehning, D. (2011). Monitoring dynamic changes in mitochondrial calcium levels during apoptosis using a genetically encoded calcium sensor. *J. Vis. Exp.* 50
156. Cereghetti, G. M., Stangherlin, A., Brito, O. M. De, Chang, C. R., Blackstone, C., and Bernardi, P. (2008). Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 15803–15808.
157. Ku, H.-H., Brunk, U. T., and Sohal, R. S. (1993). Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species. *Free Radic. Biol. Med.* 15, 621–627.
158. Novogrodsky, A., Ravid, A., Rubin, A. L., and Stenzel, K. H. (1982). Hydroxyl radical scavengers inhibit lymphocyte mitogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 1171–1174.
159. Tatla, S., Woodhead, V., Foreman, J. C., and Chain, B. (1999). The role of reactive oxygen species in triggering proliferation and IL-2 secretion in T cells. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 14–24.
160. Los, M., Dröge, W., Stricker, K., Baeuerle, P. A., and Schulze-Osthoff, K. (1995). Hydrogen peroxide as a potent activator of T lymphocyte functions. *Eur. J. Immunol.* 25, 159–165.
161. Meng, T.-C., Fukada, T., and Tonks, N. K. (2002). Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. *Mol. Cell* 9, 387–399.
162. Zhi, L., Ustyugova, I. V, Chen, X., Zhang, Q., and Wu, M. X. (2012). Enhanced Th17 differentiation and aggravated arthritis in IEX-1-deficient mice by mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling. *J. Immunol.* 189, 1639–1647.

163. Roe, T., Reynolds, T. C., Yu, G., and Brown, P. O. (1993). Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *EMBO J.* **12**, 2099–2108.
164. Budd, R. C. (2001). Activation-induced cell death. *Curr. Opin. Immunol.* **13**, 356–362.
165. Boyman, O., Létourneau, S., Krieg, C., and Sprent, J. (2009). Homeostatic proliferation and survival of naïve and memory T cells. *Eur. J. Immunol.* **39**, 2088–2094.
166. Lenz, D. C., Kurz, S. K., Lemmens, E., Schoenberger, S. P., Sprent, J., Oldstone, M. B. A., and Homann, D. (2004). IL-7 regulates basal homeostatic proliferation of antiviral CD4+T cell memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 9357–9362.
167. Domínguez-Luis, M., Herrera-García, A., Arce-Franco, M., Armas-González, E., Rodríguez-Pardo, M., Lorenzo-Díaz, F., Fera, M., Cadenas, S., Sánchez-Madrid, F., and Díaz-González, F. (2013). Superoxide anion mediates the L-selectin down-regulation induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs in human neutrophils. *Biochem. Pharmacol.* **85**, 245–256.
168. Foster, J. G., Carter, E., Kilty, I., MacKenzie, A. B., Ward, S. G. (2013). Mitochondrial superoxide generation enhances P2X7R-mediated loss of cell surface CD62L on naive human CD4+ T lymphocytes. *J. Immunol.* **190**, 1551–1559.
169. DeGrendele, H. C., Estess, P., and Siegelmann, M. H. (1997). Requirement for CD44 in activated T cell extravasation into an inflammatory site. *Science.* **278**, 672–675.
170. Reiss, Y., Proudfoot, A. E., Power, C. A., Campbell, J. J., and Butcher, E. C. (2001). CC chemokine receptor (CCR)4 and the CCR10 ligand cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) in lymphocyte trafficking to inflamed skin. *J. Exp. Med.* **194**, 1541–1547.
171. Borges, E., Tietz, W., Steegmaier, M., Moll, T., Hallmann, R., Hamann, A., and Vestweber, D. (1997). P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) on T helper 1 but not on T helper 2 cells binds P-Selectin and supports migration into inflamed skin. *J. Exp. Med.* **185**, 573–578.
172. Di Rosa, F., and Santoni, A. (2003). Memory T-cell competition for bone marrow seeding. *Immunology* **108**, 296–304.
173. Kieper, W. C., and Jameson, S. C. (1999). Homeostatic expansion and phenotypic conversion of naïve T cells in response to self peptide/MHC ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 13306–13311.
174. Goldrath, A. W., Bogatzki, L. Y., and Bevan, M. J. (2000). Naive T cells transiently acquire a memory-like phenotype during homeostasis-driven proliferation. *J. Exp. Med.* **192**, 557–564.
175. Surh, C. D., Boyman, O., Purton, J. F., and Sprent, J. (2006). Homeostasis of memory T cells. *Immunol. Rev.* **211**, 154–163.
176. Guimond, M., Veenstra, R. G., Grindler, D. J., Zhang, H., Cui, Y., Murphy, R. D., Kim, S. Y., Na, R., Hennighausen, L., Kurtulus, S., *et al.* (2009). Interleukin 7 signaling in dendritic cells regulates the homeostatic proliferation and niche size of CD4+ T cells. *Nat. Immunol.* **10**, 149–157.
177. Kennedy, M. K., Glaccum, M., Brown, S. N., Butz, E. A., Viney, J. L., Embers, M., Matsuki, N., Charrier, K., Sedger, L., Willis, C. R., *et al.* (2000). Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J. Exp. Med.* **191**, 771–780.

178. Zhang, X., Sun, S., Hwang, I., Tough, D. F., and Sprent, J. (1998). Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8<sup>+</sup> T cells in vivo by IL-15. *Immunity* 8, 591–599.
179. Kelley, W. L. (1998). The J-domain family and the recruitment of chaperone power. *Trends Biochem. Sci.* 23, 222–227.
180. Hatle, K. M., Gummadidala, P., Navasa, N., Bernardo, E., Dodge, J., Silverstrim, B., Fortner, K., Burg, E., Suratt, B. T., Hammer, J., *et al.* (2013). MCJ/DnaJC15, an endogenous mitochondrial repressor of the respiratory chain that controls metabolic alterations. *Mol. Cell. Biol.* 33, 2302–2314.
181. Van der Windt, G. J. W., O’Sullivan, D., Everts, B., Huang, S. C.-C., Buck, M. D., Curtis, J. D., Chang, C.-H., Smith, A. M., Ai, T., Faubert, B., *et al.* (2013). CD8 memory T cells have a bioenergetic advantage that underlies their rapid recall ability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 14336–14341.
182. DiMauro, S., and Schon, E. A. (2003). Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N. Engl. J. Med.* 348, 2656–2668.
183. Hutchinson, J. A., Riquelme, P., Sawitzki, B., Tomiuk, S., Miqueu, P., Zuhayra, M., Oberg, H. H., Pascher, A., Lützen, U., Janssen, U., *et al.* (2011). Cutting Edge: Immunological consequences and trafficking of human regulatory macrophages administered to renal transplant recipients. *J. Immunol.* 187, 2072–2078.
184. Ponta, H., Sherman, L., and Herrlich, P. A. (2003). CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 33–45.
185. Puré, E., and Cuff, C. A. (2001). A crucial role for CD44 in inflammation. *Trends Mol. Med.* 7, 213–221.
186. Goodison, S., Urquidi, V., and Tarin, D. (1999). CD44 cell adhesion molecules. *Mol. Pathol.* 52, 189–196.
187. Cichy, J., and Puré, E. (2003). The liberation of CD44. *J. Cell Biol.* 161, 839–843.
188. Yu, Q., and Toole, B. P. (1996). A new alternatively spliced exon between v9 and v10 provides a molecular basis for synthesis of soluble CD44. *J. Biol. Chem.* 271, 20603–20607.
189. Bajorath, J., Greenfield, B., Munro, S. B., Day, A. J., and Aruffo, A. (1998). Identification of CD44 residues important for hyaluronan binding and delineation of the binding site. *J. Biol. Chem.* 273, 338–343.
190. Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, C. B., and Seed, B. (1990). CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 61, 1303–1313.
191. Ehnis, T., Dieterich, W., Bauer, M., Lampe, B., and Schuppan, D. (1996). A chondroitin/dermatan sulfate form of CD44 is a receptor for collagen XIV (undulin). *Exp. Cell Res.* 229, 388–397.
192. Jalkanen, S., and Jalkanen, M. (1992). Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *J. Cell Biol.* 116, 817–825.
193. Weber, G. F., Ashkar, S., Glimcher, M. J., and Cantor, H. (1996). Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science*. 271, 6–9.
194. Necas, J., Bartosikova, L., Brauner, P., and Kolar, J. (2008). Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Vet. Med. (Praha)*. 8, 397–411.
195. Jiang, D., Liang, J., and Noble, P. W. (2007). Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23, 435–461.



196. Termeer, C. C., Hennies, J., Voith, U., Ahrens, T., Weiss, J. M., Prehm, P., and Simon, J. C. (2000). Oligosaccharides of hyaluronan are potent activators of dendritic cells. *J. Immunol.* *165*, 1863–1870.
197. Termeer, C., Benedix, F., Sleeman, J., Fieber, C., Voith, U., Ahrens, T., Miyake, K., Freudenberg, M., Galanos, C., and Simon, J. C. (2002). Oligosaccharides of hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* *195*, 99–111.
198. Tesar, B. M., Jiang, D., Liang, J., Palmer, S. M., Noble, P. W., and Goldstein, D. R. (2006). The role of hyaluronan degradation products as innate alloimmune agonists. *Am. J. Transplant.* *6*, 2622–2635.
199. Hawkins, C. L., and Davies, M. (1998). Degradation of hyaluronic acid, poly- and monosaccharides, and model compounds by hypochlorite: evidence for radical intermediates and fragmentation. *Free Radic. Med.* *24*, 1396–1410.
200. Jackson, D. G. (2009). Immunological functions of hyaluronan and its receptors in the lymphatics. *Immunol. Rev.* *230*, 216–231.
201. DeGrendele, H. C., Estess, P., Picker, L. J., and Siegelman, M. H. (1996). CD44 and its ligand hyaluronate mediate rolling under physiologic flow: A novel lymphocyte-endothelial cell primary adhesion pathway. *J. Exp. Med.* *183*, 1119–1130.
202. Baaten, B. J. G., Tinoco, R., Chen, A. T., and Bradley, L. M. (2012). Regulation of Antigen-Experienced T Cells: Lessons from the quintessential memory marker CD44. *Front. Immunol.* *3*, 23.
203. Yago, T., Shao, B., Miner, J. J., Yao, L., Klopocki, A. G., Maeda, K., Coggeshall, K. M., and McEver, R. P. (2010). E-selectin engages PSGL-1 and CD44 through a common signaling pathway to induce integrin  $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ -mediated slow leukocyte rolling. *Blood* *116*, 485–494.
204. Yu, Q., and Stamenkovic, I. (1999). Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes Dev.* *13*, 35–48.
205. Yu, Q., and Stamenkovic, I. (2000). Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF- $\beta$  and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* *14*, 163–176.
206. Taher, T. E. I., Smit, L., Griffioen, A. W., Schilder-Tol, E. J. M., Borst, J., and Pals, S. . (1996). Signaling through CD44 is mediated by tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* *271*, 2863–2867.
207. Ilangumaran, S., Briol, A., and Hoessli, D. C. (1998). CD44 selectively associates with active Src family protein tyrosine kinases Lck and Fyn in glycosphingolipid-rich plasma membrane domains of human peripheral blood lymphocytes. *Blood* *91*, 3901–3908.
208. Föger, N., Marhaba, R., and Zöller, M. (2000). CD44 supports T cell proliferation and apoptosis by apposition of protein kinases. *Eur. J. Immunol.* *30*, 2888–2899.
209. DeGrendele, H. C., Kosfisz, M., Estess, P., and Siegelman, M. H. (1997). CD44 activation and associated primary adhesion is inducible via T cell receptor stimulation. *J. Immunol.* *159*, 2549–2553.
210. Do, Y., Nagarkatti, P. S., and Nagarkatti, M. (2004). Role of CD44 and hyaluronic acid (HA) in activation of alloreactive and antigen-specific T cells by bone marrow-derived dendritic cells. *J. Immunother.* *27*, 1–12.

211. Lefebvre, D. C., Lai, J. C. Y., Maeshima, N., Ford, J. L., Wong, A. S. L., Cross, J. L., and Johnson, P. (2010). CD44 interacts directly with Lck in a zinc-dependent manner. *Mol. Immunol.* *47*, 1882–1889.
212. Hegde, V. L., Singh, N. P., Nagarkatti, P. S., and Nagarkatti, M. (2008). CD44 mobilization in allogeneic dendritic cell-T cell immunological synapse plays a key role in T cell activation. *J. Leukoc. Biol.* *84*, 134–142.
213. Janes, P. W., Ley, S. C., Magee, A. I., and Kabouridis, P. S. (2000). The role of lipid rafts in T cell antigen receptor (TCR) signalling. *Semin. Immunol.* *12*, 23–34.
214. Kane, L. P., Lin, J., and Weiss, A. (2000). Signal transduction by the TCR for antigen. *Curr. Opin. Immunol.* *12*, 242–249.
215. Xavier, R., Brennan, T., Li, Q., McCormack, C., and Seed, B. (1998). Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation. *Immunity* *8*, 723–732.
216. Janes, P. W., Ley, S. C., and Magee, A. I. (1999). Aggregation of Lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor. *J. Cell Biol.* *147*, 447–461.
217. Sechi, A. S., and Wehland, J. (2004). Interplay between TCR signalling and actin cytoskeleton dynamics. *Trends Immunol.* *25*, 257–265.
218. Tsukita, S., Oishi, K., Sato, N., Sagara, J., and Kawai, A. (1994). ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. *J. Cell Biol.* *126*, 391–401.
219. Legg, J. W., and Isacke, C. M. (1998). Identification and functional analysis of the ezrin-binding site in the hyaluronan receptor, CD44. *Curr. Biol.* *8*, 705–708.
220. Baaten, B. J. G., Li, C.-R., Deiro, M. F., Lin, M. M., Linton, P. J., and Bradley, L. M. (2010). CD44 regulates survival and memory development in Th1 cells. *Immunity* *32*, 104–115.
221. Guan, H., Nagarkatti, P. S., and Nagarkatti, M. (2009). Role of CD44 in the differentiation of Th1 and Th2 cells: CD44-deficiency enhances the development of Th2 effectors in response to sheep RBC and chicken ovalbumin. *J. Immunol.* *183*, 172–180.
222. Guan, H., Nagarkatti, P. S., and Nagarkatti, M. (2011). CD44 Reciprocally regulates the differentiation of encephalitogenic Th1/Th17 and Th2/regulatory T cells through epigenetic modulation involving DNA methylation of cytokine gene promoters, thereby controlling the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* *186*, 6955–6964.
223. Katoh, S., Kaminuma, O., Hiroi, T., Mori, A., Ohtomo, T., Maeda, S., Shimizu, H., Obase, Y., and Oka, M. (2011). CD44 is critical for airway accumulation of antigen-specific Th2, but not Th1, cells induced by antigen challenge in mice. *Eur. J. Immunol.* *41*, 3198–3207.
224. Bonder, C. S., Clark, S. R., Norman, M. U., Johnson, P., and Kubes, P. (2006). Use of CD44 by CD4+ Th1 and Th2 lymphocytes to roll and adhere. *Blood* *107*, 4798–4806.
225. Purvis, H. A., Stoop, J. N., Mann, J., Woods, S., Kozijn, A. E., Hambleton, S., Robinson, J. H., Isaacs, J. D., Anderson, A. E., and Hilkens, C. M. U. (2010). Low-strength T-cell activation promotes Th17 responses. *Blood* *116*, 4829–4837.
226. Nakae, S., Iwakura, Y., Suto, H., and Galli, S. J. (2007). Phenotypic differences between Th1 and Th17 cells and negative regulation of Th1 cell differentiation by IL-17. *J. Leukoc. Biol.* *81*, 1258–1268.

227. Birkeland, M. L., Johnson, P., Trowbridge, I. S., and Puré, E. (1989). Changes in CD45 isoform expression accompany antigen-induced murine T-cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *86*, 6734–6738.
228. Hermiston, M. L., Xu, Z., and Weiss, A. (2003). CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu. Rev. Immunol.* *21*, 107–137.
229. Li, R., Wong, N., Jabali, M. D., and Johnson, P. (2001). CD44-initiated cell spreading induces Pyk2 phosphorylation, is mediated by Src family kinases, and is negatively regulated by CD45. *J. Biol. Chem.* *276*, 28767–28773.
230. Mummert, M. E., Mummert, D., Edelbaum, D., Hui, F., Matsue, H., and Takashima, A. (2002). Synthesis and surface expression of hyaluronan by dendritic cells and its potential role in antigen presentation. *J. Immunol.* *169*, 4322–4331.
231. Guo, B., Wu, Y., Shinde, S., and Sy, M. (1996). Identification of a costimulatory molecule rapidly induced by CD40L as CD44H. *J. Exp. Med.* *184*, 955–961.
232. Iezzi, G., Scotet, E., Scheidegger, D., and Lanzavecchia, A. (1999). The interplay between the duration of TCR and cytokine signaling determines T cell polarization. *Eur. J. Immunol.* *29*, 4092–4101.
233. Tao, X., Constant, S., Jorritsma, P., and Bottomly, K. (1997). Strength of TCR signal determines the costimulatory requirements for Th1 and Th2 CD4+ T cell differentiation. *J. Immunol.* *159*, 5956–5963.
234. Constant, S., Pfeiffer, C., Woodard, A., Pasqualini, T., and Bottomly, K. (1995). Extent of T cell receptor ligation can determine the functional differentiation of naive CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* *182*, 1591–1596.
235. Iezzi, G., Sonderegger, I., Ampenberger, F., Schmitz, N., and Marsland, B. J. (2009). CD40-CD40L cross-talk integrates strong antigenic signals and microbial stimuli to induce development of IL-17-producing CD4+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 876–881.
236. Gomez-Rodriguez, J., Sahu, N., Handon, R., Davidson, T. S., Anderson, S. M., Kirby, M. R., August, A., and Schwartzberg, P. L. (2009). Differential expression of interleukin-17A and -17F is coupled to T cell receptor signaling via inducible T cell kinase. *Immunity* *31*, 587–597.
237. Saeki, K., Fukuyama, S., Ayada, T., Nakaya, M., Aki, D., Takaesu, G., Hanada, T., Matsumura, Y., Kobayashi, T., Nakagawa, R., *et al.* (2009). A major lipid raft protein raftlin modulates T cell receptor signaling and enhances Th17-mediated autoimmune responses. *J. Immunol.* *182*, 5929–5937.
238. Boucheron, N., Sharif, O., Schebesta, A., Croxford, A., Raberger, J., Schmidt, U., Vigl, B., Bauer, J., Bankoti, R., Lassmann, H., *et al.* (2010). The protein tyrosine kinase Tec regulates a CD44<sup>high</sup>CD62L<sup>-</sup> Th17 subset. *J. Immunol.* *185*, 5111–5119.
239. Bauquet, A. T., Jin, H., Paterson, A. M., Mitsdoerffer, M., Ho, I.-C., Sharpe, A. H., and Kuchroo, V. K. (2009). The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and TH-17 cells. *Nat. Immunol.* *10*, 167–175.
240. Galicia, G., Kasran, A., Uyttenhove, C., De Swert, K., Van Snick, J., and Ceuppens, J. L. (2009). ICOS deficiency results in exacerbated IL-17 mediated experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Clin. Immunol.* *29*, 426–433.

241. Bouguermouh, S., Fortin, G., Baba, N., Rubio, M., and Sarfati, M. (2009). CD28 co-stimulation down regulates Th17 development. *PLoS One* 4, e5087.
242. Racke, M. K., Scott, D. E., Quigley, L., Gray, G. S., Abe, R., June, C. H., and Perrin, P. J. (1995). Distinct roles for B7-1 (CD-80) and B7-2 (CD-86) in the initiation of experimental allergic encephalomyelitis. *J. Clin. Invest.* 96, 2195–2203.
243. Grimbert, P., Audard, V., Diet, C., Matignon, M., Plonquet, A., Mansour, H., Desvaux, D., Durrbach, A., Cohen, J. L., and Lang, P. (2011). T-cell phenotype in protocol renal biopsy from transplant recipients treated with belatacept-mediated co-stimulatory blockade. *Nephrol. Dial. Transplant* 26, 1087–1093.
244. Koenders, M. I., Marijnissen, R. J., Joosten, L. a B., Abdollahi-Roodsaz, S., Di Padova, F. E., van de Loo, F. A., Dulos, J., van den Berg, W. B., and Boots, A. M. H. (2012). T cell lessons from the rheumatoid arthritis synovium SCID mouse model: CD3-rich synovium lacks response to CTLA-4Ig but is successfully treated by interleukin-17 neutralization. *Arthritis Rheum.* 64, 1762–1770.
245. Laurence, A., Tato, C. M., Davidson, T. S., Kanno, Y., Chen, Z., Yao, Z., Blank, R. B., Meylan, F., Siegel, R., Hennighausen, L., *et al.* (2007). Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* 26, 371–381.
246. Acosta-Rodriguez, E. V., Rivino, L., Geginat, J., Jarrossay, D., Gattorno, M., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., and Napolitani, G. (2007). Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat. Immunol.* 8, 639–646.
247. Chen, H., Wang, W., Xie, H., Xu, X., Wu, J., Jiang, Z., Zhang, M., Zhou, L., and Zheng, S. (2009). A pathogenic role of IL-17 at the early stage of corneal allograft rejection. *Transpl. Immunol.* 21, 155–161.
248. Tammi, R., Ripellino, J. A., Margolis, R. U., and Tammi, M. (1988). Localization of epidermal hyaluronic acid using the hyaluronate binding region of cartilage proteoglycan as a specific probe. *J. Invest. Dermatol.* 90, 412–414.
249. Maeshima, N., Poon, G. F. T., Dosanjh, M., Felberg, J., Lee, S. S. M., Cross, J. L., Birkenhead, D., and Johnson, P. (2011). Hyaluronan binding identifies the most proliferative activated and memory T cells. *Eur. J. Immunol.* 41, 1108–1119.
250. Chrombios  
[http://www.chrombios.com/cms/website.php?id=/de/index/fishservice/mouse\\_es\\_cells/protocol.htm](http://www.chrombios.com/cms/website.php?id=/de/index/fishservice/mouse_es_cells/protocol.htm) (26.10.2013).
251. Heidt, S., and Wood, K. J. (2012). Biomarkers of operational tolerance in solid organ transplantation. *Expert Opin. Med. Diagn.* 6, 281–293.
252. Auchincloss, H. (2001). In search of the elusive Holy Grail: the mechanisms and prospects for achieving clinical transplantation tolerance. *Am. J. Transplant* 1, 6–12.

## 10 PUBLIKATIONSLISTE

### Wissenschaftliche Originalartikel

**Schumann, J.**, Stanko K., Wörtge, S., Appelt, C., Schumann, M., Kühl A. A., Panov, I., Schliesser, U., Vogel, S., Vaeth, M., Berberich-Siebelt, F., Waisman, A., and Sawitzki, B. (2014). The mitochondrial protein TCAIM regulates activation of T cells and thereby promotes tolerance induction of allogeneic transplants. *AJT*. DOI: 10.1111/ajt.12941.

Sawitzki, B., Brunstein, C., Meisel, C., **Schumann, J.**, Vogt, K., Appelt, C., Curtsinger, J.M., Verneris, M.R., Miller, J.S., Wagner, J.E., et al. (2013). Prevention of GVHD by adoptive T regulatory therapy is associated with active repression of peripheral blood toll-like receptor-5 mRNA expression. *Biol. Blood Marrow Transplant*. *In press*

Schliesser, U., Chopra, M., Beilhack, A., Appelt, C., Vogel, S., **Schumann, J.**, Panov, I., Vogt, K., Schlickeiser, S., Olek, S., et al. (2013). Generation of highly effective and stable murine alloreactive Treg cells by combined anti-CD4 mAb, TGF- $\beta$ , and RA treatment. *Eur. J. Immunol.* **43**, 3291–3305.

Nayak, A., Glöckner-Pagel, J., Vaeth, M., **Schumann, J.E.**, Buttmann, M., Bopp, T., Schmitt, E., Serfling, E., and Berberich-Siebelt, F. (2009). Sumoylation of the transcription factor NFATc1 leads to its subnuclear relocalization and interleukin-2 repression by histone deacetylase. *J. Biol. Chem.* **284**, 10935–10946.

Schmidt, D., Nayak, A., **Schumann, J.E.**, Schimpl, A., Berberich, I., and Berberich-Siebelt, F. (2008). Blimp-1Deltaexon7: a naturally occurring Blimp-1 deletion mutant with auto-regulatory potential. *Exp. Cell Res.* **314**, 3614–3627.

### Posterpräsentation

**Schumann, J.**, Stanko, K., Appelt, C., and Sawitzki, B. (2013). Level of CD44 expression and its function distinguishes TH17 from TH1 cells. International Congress of Immunology, Milan, Italy.

**Schumann, J.**, Stanko, K., Appelt, C., Grütz, G., and Sawitzki, B. (2013). Level of CD44 activation marker expression distinguishes allo-reactive TH17 from TH1 cells. European Congress of Immunology, Glasgow, Scotland.

---

 (Datum, Ort)

---

 Julia Schumann



## 11 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, Julia Schumann, geboren am xx.xx.xxxx in xxxxxxxxxxxx, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Hilfen verwendet habe. Ergebnisse, die in Zusammenarbeit mit anderen Arbeitsgruppen und Personen entstanden sind, wurden entsprechend gekennzeichnet.

Ich versichere, dass diese Arbeit nie in dieser oder anderer Form Gegenstand eines früheren Promotionsverfahrens war. Ich habe mich nicht anderwärtig um einen Doktorgrad beworben und besitze keinen entsprechenden Titel.

Der Inhalt der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt Universität zu Berlin (Stand 2005) ist mir bekannt.

---

(Datum, Ort)

---

Julia Schumann